sebia

# CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)

Ref. 2007

CAPILLARYS 2

IVD



2012/06

# TÉCNICA CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) EN EL SISTEMA CAPILLARYS 2

## USO

El kit CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) permite la separación en medio alcalino (pH 9,4) de las hemoglobinas normales de la sangre humana (A, F y A2) y la detección de las principales hemoglobinas anormales (especialmente las hemoglobinas S, C, E y D), mediante electroforesis capilar en el sistema automático CAPILLARYS 2.
El sistema CAPILLARYS 2 permite realizar todas las etapas de la electroforesis hasta la obtención del perfil de las hemoglobinas para el análisis cualitativo o cuantitativo. El análisis puede realizarse usando el hemolizado de glóbulos rojos sedimentados, centrifugados o lavados; el lavado de los glóbulos rojos no es indispensable.
Las hemoglobinas, separadas en capilares de sílice fundido, son detectadas directamente en una burbuja existente en el capilar mediante espectrofotometría de absorbancia a 415 nm, que es la longitud de onda de absorción específica de las hemoglobinas.
Los perfiles electroforéticos son analizados visualmente para detectar las anomalías. La detección directa proporciona automáticamente una cuantificación relativa precisa de cada fracción individual de las hemoglobinas que presenta un interés particular, como la hemoglobina A2 en el diagnóstico de las ß talasemias. Además, la buena separación de las diferentes fracciones permite confirmar la identificación de las variantes de la hemoglobina, y en particular, diferenciar la hemoglobina S de la hemoglobina D, y la hemoglobina E de la hemoglobina C.
La cuantificación de la hemoglobina A2 también se puede realizar en presencia de hemoglobina E.

Para uso en diagnóstico *In Vitro.*

## PRINCIPIO DEL TEST

La hemoglobina es una molécula compleja compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, idénticas dos a dos, estando cada cadena ligada al hemo, que es un núcleo tetrapirrólico (porfirina) ligado a un átomo de hierro. El hemo es común a todas las hemoglobinas. La parte proteica responsable del tipo de hemoglobina se denomina globina. Se conocen principalmente las cadenas polipeptídicas α, ß, δ y γ. En humanos podemos encontrar las hemoglobinas normales siguientes:
- Hemoglobina A.......................... = α 2 ß 2
- Hemoglobina A2........................ = α 2 δ 2
- Hemoglobina fetal F.................. = α 2 γ 2

La cadena α es común a estas tres hemoglobinas.

La estructura espacial de la hemoglobina (como la del resto de las proteínas) depende de la naturaleza y de la secuencia de aminoácidos que forman las cadenas. Las uniones que se forman entre los diferentes aminoácidos son responsables de la forma de la molécula, de su estabilidad y de sus propiedades. Situadas en un campo eléctrico, las hemoglobinas se desplazan en función de su carga, del tamaño de la molécula, de la fuerza iónica, del pH del tampón y de la naturaleza del soporte empleado. Las variantes de la hemoglobina son debidas a mutaciones de algunos aminoácidos que implican cargas de superficie diferentes en la hemoglobina y, por consiguiente, movilidades diferentes en la electroforesis.
Las anomalías de la hemoglobina son de dos tipos:
- anomalías cualitativas o de estructura, que se denominan hemoglobinopatías;
- anomalías cuantitativas o de regulación, que se denominan talasemias.

La electroforesis de las hemoglobinas de la sangre humana es un análisis muy útil en el laboratorio de análisis clínicos para investigar las anomalías cualitativas y cuantitativas de la hemoglobina. Paralelamente a las técnicas de electroforesis en diferentes soportes, entre los que está el gel de agarosa, se ha desarrollado la técnica de electroforesis capilar, que ofrece las ventajas de una automatización competa del análisis, separaciones rápidas y una excelente resolución. Se define como una técnica de separación electrocinética realizada en un tubo de diámetro interno inferior a 100 µm lleno de un tampón compuesto por electrolitos. Se considera una tecnología intermedia entre la electroforesis de zona en soporte y la cromatografía líquida.
El sistema CAPILLARYS 2 usa el principio de la electroforesis capilar en solución libre, que representa la forma más corriente de electroforesis capilar. Permite la separación de moléculas cargadas en función de su movilidad electroforética propia en un tampón de pH dado, y, según el pH del electrolito, de un flujo electroendosmótico más o menos importante. El sistema CAPILLARYS 2 posee una serie de capilares en paralelo, permitiendo realizar 7 análisis simultáneos. En este sistema, la inyección en los capilares de las muestras diluidas con solución hemolizante se realiza en el ánodo por aspiración. La separación se realiza a continuación aplicando una diferencia de potencial de varios miles de voltios en los extremos de cada capilar. La detección directa de las hemoglobinas se efectúa a 415 nm en el lado catódico. Los capilares se lavan antes de cada análisis con una solución de lavado, y luego con el tampón de análisis. Con el tampón de pH alcalino usado, el orden de migración de las principales hemoglobinas normales y anormales es el siguiente, del cátodo al ánodo: δA'2 (variante de A2), C, A2/O-Arab, E, S, D, G-Filadelfia, F, A, Hope, Bart, J, N-Baltimore y H. Hay que tener en cuenta que la anhidrasa carbónica no se detecta en el perfil electroforético de las hemoglobinas en la electroforesis capilar, lo que permite identificar algunas variantes de la hemoglobina A2 en su zona de migración.

## REACTIVOS SUMINISTRADOS EN EL KIT CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)

***ATENCIÓN : Ver las fichas de datos de seguridad.***

| COMPONENTES | REF. N° 2007 |
|---|---|
| Tampón (listo para usar) | 2 viales de 700 mL |
| Solución hemolizante (lista para usar) | 1 vial de 700 mL |
| Solución de lavado (solución concentrada) | 1 vial de 75 mL |
| Segmentos de dilución | 1 bolsa de 90 |
| Filtros | 4 filtros |

*PARA OBTENER RESULTADOS ÓPTIMOS :*
*Los elementos de un mismo kit deben ser usados conjuntamente y según las instrucciones suministradas.*
*LEA DETENIDAMENTE LAS INSTRUCCIONES.*

***ATENCIÓN : No use agua destilada o desionizada comercial, como por ejemplo el agua para planchar (riesgo de deterioro importante de los capilares). Use exclusivamente agua de calidad ultrapura, como el agua para inyección.***

## 1. TAMPÓN

### Preparación

El tampón está listo para usar. Contiene : tampón pH 9,4 ± 0,5 ; componentes inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

### Uso

Tampón para el análisis de las hemoglobinas mediante electroforesis capilar.

### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

El tampón debe conservarse en nevera (entre 2 y 8 °C). Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial de tampón.
No almacene el tampón a temperatura ambiente, cerca de una ventana o de una fuente de calor.
NO LO CONGELE.

**IMPORTANTE:** Después de conservarlo a 2 - 8 °C y antes de usarlo, conviene dejar que el tampón se atempere, lo que requiere unas 3 horas si el contenedor de tampón está lleno. Si esta indicación no se respeta, el funcionamiento de la técnica puede verse afectado.

***ATENCIÓN: No caliente el tampón al baño maría.***

Un contenedor de tampón empezado, instalado en el CAPILLARYS 2, es estable un máximo de **1 mes** (acumulado) a temperatura ambiente (de 15 a 30 °C). **Después de cada uso, el tampón debe conservarse imperativamente en nevera (2 - 8 °C) lo antes posible**, siendo entonces estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial de tampón.

**IMPORTANTE:** El tiempo total acumulado que el tampón puede estar a temperatura ambiente no debe exceder **1 mes**. Esta duración de conservación de 1 mes tiene en cuenta la duración de los tiempos de atemperamiento del tampón.

Deseche el tampón si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana, a un precipitado o a partículas en suspensión.

## 2. SOLUCIÓN HEMOLIZANTE

### Preparación

La solución hemolizante está lista para usar. Contiene : tampón pH 8,5 ± 0,5 ; componentes inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

### Uso

Para la dilución y la hemólisis de los glóbulos rojos.

### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Almacenar la Solución Hemolizante a temperatura ambiente (de 15 a 30 °C) o refrigerada (entre 2 y 8 °C). Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en las etiquetas del vial. NO LA CONGELE.
Deseche la solución hemolizante si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana, a un precipitado a partículas en suspensión.

## 3. SOLUCIÓN DE LAVADO

### Preparación

El vial de solución de lavado concentrada debe completarse hasta 750 mL con agua destilada o desionizada.
Después de la dilución, la solución de lavado contiene una solución alcalina pH ≈ 12.

### Uso

Para lavar los capilares después de la separación electroforética de las hemoglobinas.

**IMPORTANTE:** Antes de llenar el contenedor de solución de lavado, se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el cuello del contenedor, el conector y el tubo para evitar la acumulación de sales.

### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Las soluciones de lavado concentrada y diluida deben conservarse a temperatura ambiente o en nevera en contenedores cerrados para evitar la evaporación. La solución concentrada es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial de solución de lavado.
La solución diluida es estable durante 3 meses.
Deseche la solución de lavado diluida si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana.

## 4. SEGMENTOS DE DILUCIÓN

### Uso

Segmentos de dilución coloreados, de un solo uso, específicos de la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), para que el aparato realice la dilución de las muestras de sangre. Deben colocarse en el cargador de muestras.

***ATENCIÓN: Manipule con precaución los segmentos de dilución que contengan muestras biológicas.***

## 5. FILTROS

### Uso

Filtros de un solo uso para el filtrado del tampón, la solución hemolizante (**en el sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING**), la solución de lavado reconstituida y el agua destilada o desionizada (usada para la limpieza de los capilares).

**IMPORTANTE:** Cambie sistemáticamente los filtros al empezar un nuevo kit.

Enrosque un filtro al final de cada tubo que cuelga de los tapones de los contenedores de tampón, solución hemolizante, solución de lavado y agua destilada o desionizada. Al cambiar los filtros, lave los conectores y los tubos con agua destilada o desionizada. Los filtros usados también deben lavarse con agua antes de desecharlos.

### Conservación

Antes de usarlos, los filtros deben conservarse en su embalaje original herméticamente cerrado en un lugar seco a temperatura ambiente o en nevera.

## REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

***ATENCIÓN : Ver las fichas de datos de seguridad.***

### 1. CONTROL Hb A2 NORMAL

#### Composición

El Control Hb A2 Normal (SEBIA, referencia nº 4778) se obtiene a partir de una mezcla de sangres humanas normales. Un procedimiento de estabilización permite conservar el Control Hb A2 Normal en forma liofilizada.

#### Aplicación

El Control Hb A2 Normal está destinado al control de migración antes de iniciar una nueva serie de análisis, después del análisis de 10 cargadores sucesivos y al final de una serie de análisis, así como al control de calidad del método de determinación de la hemoglobina humana A2 mediante la técnica electroforética CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) en el CAPILLARYS 2.
Reconstituya, con precisión, cada vial liofilizado de Control Hb A2 Normal con el volumen de agua destilada o desionizada indicado en las instrucciones del Control Hb A2 Normal. Déjelo en reposo 30 minutos y después agítelo suavemente (evite la formación de espuma).

**Control de migración**: El Control Hb A2 Normal debe ser usado de la forma siguiente:
- Dispense el Control Hb A2 Normal reconstituido en un microtubo.
- Corte el tapón del microtubo.
- Ponga el microtubo, colocado en un tubo de hemólisis nuevo que servirá de soporte (e identificado con la etiqueta de códigos de barras del Control Hb A2 Normal), en la posición 1 del cargador específico nº 0 del CAPILLARYS 2, previsto a tal efecto, y coloque un segmento de dilución verde nuevo en el cargador.
- Dispense 4 mL de solución hemolisante CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) en un tubo de hemólisis sin que se formen burbujas de aire y coloque este tubo en la posición 8 del cargador nº 0.
  **IMPORTANTE:** Compruebe que no haya espuma en el tubo de solución hemolisante antes de colocarlo en el cargador.
- Inicio del análisis: Introduzca el cargador nº 0 en el sistema CAPILLARYS 2, seleccione en la ventana que aparece en pantalla "Dilución automática" y valide.
- **Después de cada cambio del contenedor del tampón de análisis (incluso si el lote es el mismo) o del modo de trabajo, después de un ciclo de limpieza de los capilares con el CAPICLEAN, después de una actualización del programa o después de una activación de los capilares**, realice una segunda serie de análisis con el control, volviendo a introducir inmediatamente el mismo cargador n° 0 con el mismo segmento de dilución que contiene el Control Hb A2 Normal diluido en el primer análisis, y con el tubo de hemólisis vacío identificado con el código de barras del Control Hb A2 Normal en la posición 1. En la ventana que aparece en pantalla con el título « Control Hb A2 Normal », seleccione « Dilución manual » y valide.

Los resultados obtenidos son entonces tenidos en cuenta automáticamente por el programa para el análisis de los resultados.

**IMPORTANTE:** El pico de hemoglobina A del Control Hb A2 Normal debe presentar una densidad óptica (DO) mínima de 0,10. Por debajo de este valor el centrado del perfil electroforético no se puede hacer correctamente. Durante el análisis de las muestras, la identificación de las fracciones de la hemoglobina, Hb A, Hb F, Hb A2 y Hb C, así como la determinación de la zona de migración de otras variantes corren el riesgo de ser imposibles o erróneas (vea el párrafo ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS).

**IMPORTANTE:** Para un uso óptimo del Control Hb A2 Normal, es indispensable usar las etiquetas con códigos de barras destinadas a identificar el tubo de hemólisis que servirá de soporte al microtubo que contiene el Control Hb A2 (corte el tapón del microtubo antes de usarlo).

*NOTAS : Antes de usar por primera vez el programa de análisis "HEMOGLOBIN(E)" en el instrumento para electroforesis CAPILLARYS 2, o después de una parada prolongada (más de una semana), se recomienda realizar 3 series de análisis sucesivas con el Control Hb A2 Normal.*

*Después de instalar el instrumento automático CAPILLARYS 2, al realizar la primera serie de análisis de sangres, aparecerá un símbolo de alerta rojo en caso de ausencia de hemoglobina A en una de las muestras (que indica que no es posible centrar el perfil, vea el párrafo "Análisis de los resultados").*

*Se aconseja entonces analizar una muestra que contenga hemoglobina A en el capilar afectado y volver a analizar la muestra sin hemoglobina A colocándola en un capilar que ya haya detectado la presencia de hemoglobina A.*

**Control de calidad**: El Control Hb A2 Normal debe ser usado como una sangre humana normal. Después de la reconstitución, use directamente el Control Hb A2 Normal como una muestra de sangre a analizar o como control de la migración (con el cargador nº 0, vea el párrafo anterior). Será tratado automáticamente con la solución hemolisante. Se recomienda incluir el Control Hb A2 Normal en cada serie de análisis. Los valores obtenidos deben estar comprendidos entre los valores específicos de cada lote.

**IMPORTANTE:** Para un uso óptimo del Control Hb A2 Normal colocado en un cargador cualquiera, es indispensable usar una etiqueta con código de barras, destinada a identificar el tubo de hemólisis que servirá de soporte al microtubo que contenga el Control Hb A2 (corte el tapón del microtubo antes de usarlo).

#### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

*Vea las instrucciones de uso del Control Hb A2 Normal.*

Como ninguna prueba de análisis puede probar la ausencia de los virus VIH, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C o de cualquier otro agente infeccioso, el Control Hb A2 Normal debe ser manipulado con las precauciones habituales para evitar contaminarse.
Esta sangre control, analizada usando técnicas aceptadas por una autoridad competente (FDA, ANSM…), es negativa :
- para la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B,
- para la presencia de anticuerpos anti-VHC,
- para la presencia de anticuerpos anti-VIH 1 y anti-VIH 2.

### 2. AGUA DESTILADA O DESIONIZADA

#### Uso

Para lavar los capilares del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS 2, SEBIA.
Se recomienda usar agua destilada o desionizada filtrada (con un filtro de porosidad ≤ 0,45 µm).
Renueve el agua cada día para evitar contaminaciones microbianas. En caso de conservación prolongada, añada 350 µL/L de CLEAN PROTECT (SEBIA, referencia nº 2059: 1 vial de 5 mL).

**IMPORTANTE:** Antes de llenar el contenedor de agua, se recomienda lavarlo con agua destilada o desionizada.

## 3. CAPICLEAN

### Presentación

El vial de la solución enzimática concentrada CAPICLEAN (SEBIA, referencia nº 2058: 1 vial de 25 mL) contiene: enzimas proteolíticos, surfactantes y aditivos, inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

***ATENCIÓN: La solución CAPICLEAN puede causar irritación o quemaduras cutáneas, oculares o de las mucosas.***

### Uso

Para la limpieza de la cánula de muestras del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS 2, SEBIA, durante el ciclo de limpieza CAPICLEAN.

**IMPORTANTE:** Realice un ciclo de limpieza con CAPICLEAN como mínimo una vez por semana y como máximo una vez al día, o cada 500 análisis cuando se realicen en menos de una semana.

*Consulte las instrucciones de uso del CAPICLEAN, SEBIA.*

**IMPORTANTE:** Después de la limpieza de la cánula de muestras, no reutilice el segmento de dilución.

### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

El CAPICLEAN debe conservarse en nevera (entre 2 y 8 °C). Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. NO LO CONGELE.

Pueden observarse un precipitado o partículas agregadas en suspensión (flóculos) en el vial del CAPICLEAN sin que su funcionamiento se vea afectado.

No resuspenda el precipitado o las partículas. Se recomienda pipetear sólo el sobrenadante.

## 4. SOLUCIÓN DE HIPOCLORITO DE SODIO (para la limpieza de la cánula de muestras)

### Preparación

Prepare una solución de hipoclorito de sodio (lejía) con un 2 - 3 % de cloro, a partir de una dosis concentrada de 250 mL con un 9,6 % de cloro diluida hasta 1 litro (volumen final) con agua destilada o desionizada fría.

### Uso

Para limpiar la cánula de muestras del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS 2, SEBIA (mantenimiento semanal para eliminar cualquier proteína que se haya adsorbido a la cánula).

*Consulte las instrucciones de uso del CAPILLARYS 2, SEBIA.*

- Use el cargador de muestras específico para el mantenimiento (n° 100).
- Coloque en este cargador, en la posición 1, un tubo de hemólisis que contenga 2 mL de solución de hipoclorito de sodio preparada anteriormente.
- Introduzca el cargador n° 100 de mantenimiento en el sistema CAPILLARYS 2.
- En el menú de la ventana "MANTENIMIENTO" que aparecerá en pantalla, seleccione la opción "Iniciar la limpieza de la cánula (solución de hipoclorito de sodio)", y luego valide.

### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

La solución de hipoclorito de sodio diluida puede conservarse 3 meses a temperatura ambiente en un recipiente de plástico cerrado herméticamente, protegido de los rayos solares y de cualquier fuente de calor o ignición, y alejado de los ácidos y del amoniaco.

## 5. SOLUCIÓN DE LAVADO CAPILLARYS / MINICAP

### Preparación

El vial de la solución de lavado concentrada (SEBIA, referencia nº 2052: 2 viales de 75 mL) debe completarse hasta 750 mL con agua destilada o desionizada.

Después de la dilución, la solución de lavado contiene una solución alcalina pH ≈ 12.

### Uso

Para lavar los capilares del CAPILLARYS 2. Reactivo adicional necesario en caso de realizar series inferiores a 40 análisis.

**IMPORTANTE :** Antes de llenar el contenedor de solución de lavado, se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el cuello del contenedor, el conector y el tubo para evitar la acumulación de sales.

### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Las soluciones de lavado concentrada y diluida deben conservarse a temperatura ambiente o en nevera en contenedores cerrados para evitar la evaporación. La solución concentrada es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial.

La solución diluida es estable durante 3 meses.

Deseche la solución de lavado diluida si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana.

## 6. SALINA

### Preparación

Solución de NaCl 0,15 M (9 g/L) en agua destilada o desionizada.

### Uso

Para lavar los glóbulos rojos antes de conservarlos a - 80 °C, si es necesario.

### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

La solución salina puede conservarse a temperatura ambiente o en nevera.

Deseche la solución al cabo de 3 meses o si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana. Para una conservación prolongada, añada 1 g/L de azida sódica.

*NOTAS :*

*Las pruebas realizadas durante la validación de los reactivos muestran que, para las diferentes soluciones y usando material adaptado al volumen a reconstituir, una variación del volumen final de un ± 5 % no tiene ningún efecto adverso en el análisis.*

*El agua destilada o desionizada, usada para la reconstitución de las soluciones, debe estar exenta de contaminación bacteriana o fúngica (use un filtro de 0,22 µm) y debe tener una resistividad superior a 10 Megohms x cm.*

## EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS

1. Sistema de electroforesis capilar CAPILLARYS 2 SEBIA, referencia n° 1222.
2. Cargadores de muestras, suministrados con el sistema CAPILLARYS 2.
3. Contenedores de plástico suministrados con el sistema CAPILLARYS 2: contenedor para la limpieza de los capilares (debe llenarse con agua destilada o desionizada), contenedor de solución de lavado y contenedor de desechos.

## MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS

### Extracción y conservación de las muestras

El análisis se realiza con sangres frescas, recogidas en anticoagulante (EDTA, citrato o heparina). No use anticoagulantes que contengan yodoacetato. Las sangres deben ser obtenidas según los métodos establecidos de uso en el laboratorio clínico.
Las sangres pueden conservarse un máximo de siete días en nevera (entre 2 y 8 °C).
Para conservaciones prolongadas, congele rápidamente las muestras a - 80 °C (como máximo durante las 8 horas siguientes a su obtención) después de haber lavado los glóbulos rojos según el procedimiento siguiente: centrifugue la sangre total, durante 5 minutos a 5.000 r.p.m.; elimine el plasma; lave 2 veces los glóbulos rojos con 10 volúmenes de salina (centrifugue después de cada lavado) y elimine el exceso de salina de la superficie del coágulo globular lavado; agite en el vórtex antes de congelarlo.
Las sangres congeladas a - 80 °C son estables un máximo de 3 meses.

**IMPORTANTE:** Para una conservación óptima de las muestras, no las conserve a - 20 °C sino a - 80 °C (vea la BIBLIOGRAFÍA: J Bardakdjian-Michau *et al*, 2003).

*NOTA: No conserve las sangres a temperatura ambiente.*

Las hemoglobinas (Hb) de las muestras conservadas entre 2 y 8 °C se degradan progresivamente.
En una muestra conservada más de 7 días en nevera:
- como consecuencia de la degradación de la muestra, aparece una fracción débil, correspondiente a metahemoglobina, en la zona de migración de la Hb S,
- en presencia de Hb C, aparece una fracción correspondiente a la Hb C degradada en posición anódica respecto a la Hb A2, pero sin ninguna interferencia con ésta (zona Z4, vea la tabla del párrafo " Interpretación "),
- en presencia de Hb O-Arab, aparece una fracción correspondiente a Hb O-Arab degradada en la zona de migración de la Hb S (zona Z5, vea la tabla, párrafo " Interpretación "),
- en presencia de Hb E, aparece una fracción correspondiente a Hb E degradada en la zona Z6 (vea la tabla del párrafo " Interpretación "),
- en presencia de Hb S, aparece una fracción correspondiente a Hb S degradada en la zona de migración de la Hb F (zona Z7, vea la tabla del párrafo " Interpretación "),
- en presencia de Hb A, aparece una fracción correspondiente a Hb A degradada en posición anódica respecto a la Hb A (zona Z11, vea la tabla del párrafo " Interpretación ").

En presencia de Hb F (en el caso de sangres de recién nacidos), aparece una fracción en la zona de migración de la Hb A (zona Z9, vea la tabla del párrafo " Interpretación ") como consecuencia de una degradación de la muestra.
Si la muestra se ha conservado más de 10 días en nevera, se observa la presencia de aglomerados viscosos en los glóbulos rojos: es indispensable eliminarlos antes de realizar el análisis.

### Preparación de las muestras

- Deje sedimentar los glóbulos rojos de la sangre total durante varias horas en nevera (2 - 8 °C) o centrifugue la sangre total durante 5 minutos a 5.000 r.p.m.
- Elimine con cuidado el máximo de plasma (en las muestras recogidas en heparina, elimine los aglomerados viscosos presentes en la interfase plasma / glóbulos rojos).
- **Agite en el vórtex durante 5 segundos.**

**IMPORTANTE:** No use muestras que contengan una altura máxima de plasma residual superior a 3 mm; si hay más de 3 mm de plasma el análisis puede verse afectado.

Casos especiales: Análisis de muestras sin Hb A ó Hb A2 (estas muestras pueden ser cuantificadas pero no caracterizadas mediante las zonas de identificación).
Para identificar las fracciones de hemoglobina presentes en una muestra sin hemoglobina A o hemoglobina A2, se recomienda preparar la muestra siguiendo uno de los dos métodos siguientes:
Dilución automática:
- En un microtubo, mezcle un volumen (80 $\mu$L) de glóbulos rojos de la muestra a analizar y un volumen de Control Hb A2 Normal (80 $\mu$L).
- Agite en el vórtex durante 5 segundos.
- Corte el tapón del microtubo.
- Ponga el microtubo en un tubo de hemólisis nuevo que servirá de soporte y después colóquelo en un cargador de muestras del CAPILLARYS 2.
- Realice el análisis de la muestra siguiendo el procedimiento habitual.

Dilución manual:
- Mezcle directamente en los pocillos de un segmento de dilución verde nuevo, 9 $\mu$L de Control Hb A2 Normal reconstituido con 9 $\mu$L de la muestra a analizar y 90 $\mu$L de solución hemolizante CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E).
- Agite la mezcla mediante pipeteos sucesivos.
- Ponga este segmento en el cargador nº 0 del CAPILLARYS 2.
- Introduzca el cargador en el sistema CAPILLARYS 2, y luego seleccione en la ventana que aparece en pantalla la opción "Sample" en "dilución manual" y valide.

Los resultados obtenidos son entonces tenidos en cuenta automáticamente por el programa para el tratamiento de los datos.

**IMPORTANTE:** En una muestra sin Hb A ó Hb A2 preparada según estos dos métodos, la cuantificación de las fracciones indicada en el perfil electroforético no tiene ningún significado y los valores obtenidos no deben ser tenidos en cuenta; este procedimiento sólo permite la identificación de la o las variantes presentes en la muestra mediante las zonas de identificación, gracias a que migrarán en la zona correcta.

La cuantificación de las fracciones se obtiene en este caso analizando la muestra inicial no mezclada (antes de diluirla con la sangre control).

### Muestras a descartar

- No use muestras de sangre total no sedimentadas.
- No use muestras de sangre antiguas o mal conservadas, ya que la hemólisis automática de las muestras puede ser perturbada por la presencia de aglomerados viscosos entre los glóbulos rojos; el perfil electroforético puede también ser afectado por los productos de degradación de las hemoglobinas (o por artefactos).

## PROCEDIMIENTO

El sistema CAPILLARYS 2 es un instrumento multiparamétrico automático que permite realizar el análisis de las hemoglobinas en 7 capilares en paralelo según las etapas siguientes:

- lectura de los códigos de barras de los tubos primarios (hasta 7) y del cargador;
- hemólisis y dilución de las muestras a partir de tubos primarios (sin plasma);
- lavado de los capilares;
- inyección de las muestras hemolizadas;
- separación y detección directa de las hemoglobinas en los capilares.

Las etapas manuales son las siguientes:

- colocación de los tubos primarios (destapados) en los cargadores, en las posiciones 1 a 7;
- colocación del tubo de solución hemolizante en la posición 8 del cargador;
- colocación de un segmento de dilución nuevo en el cargador;
- introducción en el sistema CAPILLARYS 2;
- recuperación de los cargadores después del análisis.

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS 2.

### I. PREPARACIÓN DEL ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

1. Encienda el CAPILLARYS 2 y el ordenador de control.
2. Abra el programa de gestión PHORESIS (CAPILLARYS 2) y valide el nivel de los reactivos, tras lo cual el aparato se iniciará automáticamente.
3. Use el kit CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) con el programa de análisis "HEMOGLOBIN(E)". Para seleccionar el programa de análisis "HEMOGLOBIN(E)" y conectar el contenedor de tampón CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) al aparato, lea detenidamente el manual de instrucciones del CAPILLARYS 2.
4. El cargador de muestras posee 8 posiciones para tubos. Coloque hasta 7 tubos primarios sin plasma en cada cargador (posiciones 1 a 7), destapando cada tubo y de forma que el código de barras de cada tubo quede encarado hacia la ventana de lectura del mismo.

   **IMPORTANTE:** Si el número de tubos que va a analizar es inferior a 7, complete el cargador poniendo tubos con agua destilada o desionizada.
5. Dispense 4 mL de solución hemolizante CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) en un tubo de hemólisis sin que se formen burbujas de aire, y coloque este tubo en la posición 8 del cargador de muestras.

   **IMPORTANTE:** Compruebe que no haya espuma en el tubo de solución hemolizante antes de colocarlo en el cargador.
6. Ponga un segmento de dilución nuevo en cada cargador. En caso de ausencia del segmento, el cargador será expulsado.
7. Introduzca el (o los) cargador(es) completo(s) en el sistema CAPILLARYS 2 por el orificio de entrada situado en medio del aparato. Se pueden introducir hasta trece cargadores a la vez, pudiéndose añadir nuevos cargadores de forma continua a medida que se vaya completando el análisis de los cargadores ya introducidos. Cuando quiera analizar una sangre control, use el cargador específico n° 0, previsto a este efecto.
8. Saque de la cinta de salida, situada a la izquierda del aparato, los cargadores ya analizados.
9. Coja con precaución el segmento de dilución usado y deséchelo.

   ***ATENCIÓN: Manipule con cuidado los segmentos de dilución que contengan muestras biológicas.***

### DILUCIÓN - MIGRACIÓN - DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

1. Lectura de los códigos de barras de los tubos primarios de muestra y del cargador.
2. Dilución de las sangres con la solución hemolizante, con limpieza de la cánula de muestras entre cada dilución.
3. Lavado de los capilares.
4. Inyección de las muestras diluidas en los capilares.
5. Migración a voltaje constante con temperatura controlada por efecto Peltier, durante unos 8 minutos.
6. Lectura a 415 nm y aparición simultánea del perfil de las hemoglobinas en la pantalla del ordenador.

*NOTA: Estas etapas se realizan consecutivamente para el primer cargador introducido: los perfiles correspondientes a los tubos analizados se obtienen al cabo de unos 20 minutos. Para el cargador de muestras siguiente, las fases 1 y 2 (lectura de los códigos de barras y hemólisis de las sangres) se realizan durante la etapa 5 (migración) del cargador anterior.*

### II. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al final del análisis se realiza automáticamente la cuantificación relativa de las fracciones y los perfiles pueden ser interpretados. Los picos de hemoglobina A (Hb A), F (Hb F) y A2 (Hb A2) son identificados de forma automática y el pico de Hb A es situado en el centro de la ventana de edición de las curvas. Los perfiles electroforéticos obtenidos deben ser analizados visualmente para detectar las anomalías.
Las posiciones potenciales de las diferentes variantes de la hemoglobina (identificadas por las zonas Z1 a Z15) se muestran en la ventana de edición y aparecen en el informe de resultados. La tabla del párrafo "Interpretación" presenta las variantes conocidas que pueden estar presentes en cada zona.
Cuando el programa identifica una fracción de hemoglobina en una zona determinada, el nombre de esa zona es enmarcado.

Los perfiles son centrados automáticamente respecto al pico de Hb A para facilitar su interpretación:

- en caso de ausencia de detección de los picos de Hb A y / o Hb A2 en un perfil, aparece un símbolo de alerta amarillo, y el centrado del perfil se realiza entonces usando la posición del pico de Hb A de los dos últimos perfiles obtenidos anteriormente en el mismo capilar, y ningún pico es identificado (excepto cuando se detecta Hb C: en este caso, los picos de Hb A2 y de Hb C son identificados) ;
- en caso de presencia de Hb F en un perfil, sin detección de Hb A, el símbolo amarillo de alerta no aparece, y el centrado del perfil se realiza entonces respecto a la posición del pico de Hb F y los picos de Hb F y / o Hb A y / o Hb A2 son identificados ;
- en caso de imposibilidad de centrado del perfil, aparece un símbolo rojo de alerta y los picos de Hb F y de Hb A2 no son identificados (en este caso, contacte con el Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA) ;
- en caso de densidad óptica insuficiente en un perfil electroforético del control de migración (obtenido con el Control Hb A2 Normal identificado con su etiqueta con código de barras y analizado en un cargador n° 0), aparece un mensaje de advertencia que permite usar o descartar este análisis para la determinación de la posición del pico de Hb A. Después aparece un símbolo de advertencia violeta en la ventana de edición y los picos de Hb A y Hb A2 no son identificados.

En todos los casos, las diferentes zonas de migración (Z1 a Z15) no aparecerán ni en pantalla ni en el informe de resultados.

En el perfil electroforético, las curvas de las hemoglobinas A2 y C, calculadas por triangulación, son redibujadas (o ajustadas) y superpuestas a la curva nativa. Esta representación permite la cuantificación de la fracción Hb A2 en presencia de Hb C.

***ATENCIÓN: En algunos casos de hemoglobina C (homozigosis) o debido a un problema técnico, las fracciones de Hb A2 y Hb C no son ajustadas, lo que implica una infravaloración de estas fracciones. Se recomienda entonces cuantificar la fracción Hb A2 usando otra técnica.***

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS 2.

### III. FIN DE LA SECUENCIA DE ANÁLISIS

El usuario debe realizar el procedimiento de extinción al final de la sesión de trabajo para conservar los capilares en condiciones óptimas.

### IV. LLENADO DE LOS CONTENEDORES DE REACTIVO

El aparato automático CAPILLARYS 2 permite una gestión automática de los reactivos.

**IMPORTANTE:** Es necesario seguir el procedimiento previsto para el cambio de los contenedores de reactivo (si no se hace correctamente los contenedores pueden despresurizarse y los análisis pueden verse afectados) y respetar el código de colores contenedor - conector en cada cambio de contenedor.

La aparición de la ventana de gestión de los reactivos indica que es necesario cambiar uno o varios reactivos:

- colocar un nuevo contendor de tampón de análisis y/o,
- llenar el contenedor de lavado con la solución de lavado reconstituida y/o,
- llenar el contenedor de limpieza con agua destilada o desionizada filtrada y/o,
- vaciar el contenedor de desechos.

***ATENCIÓN : No use agua destilada o desionizada comercial, como por ejemplo el agua para planchar (riesgo de deterioro importante de los capilares). Use exclusivamente agua de calidad ultrapura, como el agua para inyección.***

**IMPORTANTE:** Se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el contenedor de limpieza antes de llenarlo.

*Consulte el manual de instrucciones del CAPILLARYS 2.*

## CONTROL DE CALIDAD

Después de cada cambio de lote del tampón de análisis o de modo de trabajo, o después de un ciclo de limpieza de los capilares con CAPICLEAN, **y antes de iniciar una nueva serie de análisis**, es necesario realizar dos series de análisis con el Control Hb A2 Normal, SEBIA, referencia nº 4778, usando el cargador nº 0 específico previsto a este efecto (vea el capítulo REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS).

También se recomienda incluir una sangre de control en cada serie de análisis (por ejemplo, una muestra de control que contenga las hemoglobinas A, F, S y C, como el Control Hb AFSC, SEBIA, referencia nº 4792, o una sangre normal, el Control Hb A2 Normal, SEBIA, referencia nº 4778, o el Control Hb A2 Patológico, SEBIA, referencia nº 4779).

## RESULTADOS

### Valores

La detección directa en el capilar a 415 nm permite definir las concentraciones relativas (porcentajes) de cada fracción.

Los valores normales de cada fracción de hemoglobina han sido establecidos a partir de una población de 113 adultos (hombres y mujeres) en buen estado de salud, que presentan valores normales en HPLC:

Hemoglobina A: comprendida entre 96,7 y 97,8 %
Hemoglobina F: ≤ 0,5 % (*)
Hemoglobina A2: comprendida entre 2,2 y 3,2 %

*(*) Vea Interferencias y limitaciones*

*Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores normales.*

*NOTA: Los valores normales han sido obtenidos con los parámetros de integración por defecto del programa (alisado 0 e integración automática de las fracciones de la hemoglobina con la técnica HEMOGLOBIN(E)).*

***ATENCIÓN: Los valores normales (valores de referencia) sólo deben ser tenidos en cuenta en ausencia de variantes de la hemoglobina.***

## Interpretación

Vea PERFILES ELECTROFORÉTICOS, figuras 1 - 15.

Las diferentes zonas de migración de las variantes (identificadas como Z1 a Z15) aparecen en la ventana de edición de las curvas y en el informe de resultados. Al pasar el cursor del ratón sobre el nombre de una zona aparece una burbuja informativa que indica las variantes posibles de la hemoglobina que migran en esa zona.
Para cada fracción, la posición del máximo define la zona de migración.
Vea la tabla que muestra las variantes potenciales presentes en cada zona.
***ATENCIÓN: La graduación del eje de abscisas no puede en ningún caso usarse para la identificación de una variante de la hemoglobina.***

*1. Anomalías cualitativas: Hemoglobinopatías*

La mayoría son anomalías estructurales, debidas a una sustitución por mutación de un aminoácido por otro en una de las cadenas. Las consecuencias de la mutación varían en función de la posición del aminoácido mutado y del que le remplaza, siendo particularmente necesaria la integridad de algunas partes de la molécula para que sea viable y funcione correctamente.
Se han definido y descrito más de 900 variantes de la hemoglobina adulta. Las primeras hemoglobinas anormales estudiadas, y las más numerosas, son debidas a una modificación de la carga eléctrica global de la molécula, lo que permite detectarlas fácilmente por electroforesis.
Cinco hemoglobinas anormales principales presentan un interés particular desde un punto de vista antropológico y médico: S, C, E, O-Arab y D.
El kit CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) está destinado a la detección de las hemoglobinopatías y las talasemias.

**Hemoglobina S**

Es la variante más frecuente, y es debida a una sustitución por mutación de un ácido glutámico de la cadena ß (aminoácido ácido) por una valina (aminoácido neutro): presenta pues un punto isoeléctrico aumentado respecto a la hemoglobina A. Su carga negativa global está por tanto disminuida en el pH de análisis: esta hemoglobina migra más rápidamente que la hemoglobina A. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), en tampón alcalino, la hemoglobina S migra entre las fracciones A y A2, a más o menos 1/3 de la distancia A - A2, de lado de la A2.

**Hemoglobina C**

La mutación es debida a un ácido glutámico de la cadena ß sustituido por una lisina (aminoácido alcalino): presenta pues un punto isoeléctrico aumentado respecto a la hemoglobina A. Su carga negativa global está por tanto disminuida en el pH del análisis: esta hemoglobina migra más rápidamente que las hemoglobinas A y A2, de las que está parcialmente separada, lo que mejora netamente el diagnóstico médico.
Además, las hemoglobinas C, E, y O-Arab no se superponen en el perfil electroforético y pueden por tanto ser distinguidas fácilmente.

**Hemoglobina E**

Un ácido glutámico de la cadena ß está sustituido por una lisina. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), la hemoglobina E migra justo después de la hemoglobina A2, de la que está totalmente separada. En presencia de la hemoglobina E, la fracción A2 puede por tanto ser cuantificada para detectar una b talasemia.

**Hemoglobina O-Arab**

Un ácido glutámico de la cadena ß está sustituido por una lisina. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), la hemoglobina O-Arab migra con la fracción A2. En este caso, la cuantificación de la hemoglobina A2 es imposible. Cuando esta fracción es superior a un 9 %, puede sospecharse la presencia de la hemoglobina O-Arab. Esta última no puede ser confundida con las hemoglobinas C y E, ya que éstas están separadas de la fracción A2.

**Hemoglobina D**

Un ácido glutámico de la cadena ß está sustituido por una glutamina. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), la hemoglobina D (denominada D-Punjab, D-Los Angeles, D-Chicago ó D-Portugal) migra en posición anódica respecto a la hemoglobina S, lo que permite distinguirla de ésta.

*2. Anomalías cuantitativas: Talasemias*

Constituyen un grupo bastante heterogéneo de afecciones genéticas caracterizadas por la reducción de la tasa de síntesis de una o varias cadenas de la hemoglobina. El mecanismo de esta reducción a escala molecular todavía no es bien conocido.
Existen diferentes síndromes talasémicos:

**Alfa talasemias**

Se caracterizan por la disminución de la síntesis de las cadenas $\alpha$, afectando por consiguiente a la síntesis de las 3 hemoglobinas fisiológicas. El exceso de síntesis de las cadenas ß y $\gamma$ respecto a las cadenas a provoca la formación de tetrámeros sin cadenas $\alpha$:

- Hemoglobina Bart = $\gamma$ 4,
- Hemoglobina H = ß 4.

La hemoglobina H posee un punto isoeléctrico relativamente bajo. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), migra en una posición mucho más anódica que la hemoglobina A (y puede estar presente en forma de una o varias fracciones).

**Beta-talasemias**

Se caracterizan por la disminución de la síntesis de las cadenas ß. Sólo se ve afectada la síntesis de la hemoglobina A.
Les porcentajes de las hemoglobinas F y A2 están por tanto aumentados respecto a la hemoglobina A. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), los valores de las diferentes hemoglobinas normales obtenidos permiten detectar los casos de beta talasemias.

*3. Notas*

- En caso de ausencia de la hemoglobina A, se puede observar una fracción débil en la zona de migración de esta última. Se trata de una hemoglobina F acetilada que representa de un 15 a un 25 % de la hemoglobina F. El sistema CAPILLARYS 2 está programado automáticamente para evitar confundir esta fracción acetilada con la hemoglobina A.
- Puede sospecharse la presencia de una variante de la hemoglobina A2 si una fracción que presenta un porcentaje débil (de 0,5 a 3 %) es observada en una zona de migración comprendida entre la hemoglobina F y la hemoglobina δA'2 (variante de la A2), incluso dentro de las zonas de migración habituales de las hemoglobinas.
- Si está presente una variante de la hemoglobina A2 (δA'2 o cualquier otra variante de la A2), se recomienda sumar el porcentaje de esta variante al de la hemoglobina A2 para un mejor diagnóstico de las beta-talasemias.
- Algunas variantes de la hemoglobina (Hb Camperdown y Hb Okayama, por ejemplo) migran muy cerca de la Hb A y pueden ser confundidas con esta última.
- Algunas variantes de la hemoglobina (Hb Porto-Alegre y Hb S degradada) migran muy cerca de la Hb F y pueden ser confundidas con esta última.
- Las fracciones débiles que migran en la zona Z12 son a veces mal integradas (Hb Bart demasiado asimétricas, por ejemplo). Es necesario entonces suprimir la integración automática e integrarlas manualmente.
- Al analizar sangres de recién nacidos, las muestras que contengan Hb F en concentraciones elevadas pueden presentar una fracción Hb A perturbada, especialmente a causa de la migración de la Hb F degradada en esta zona. El porcentaje de Hb A indicado por el programa puede estar entonces sobreestimado. Además, en caso de presencia de variantes de la hemoglobina (> 4 %; S, C, E ó D-Punjab por ejemplo) en una sangre que contenga una concentración elevada de Hb F (> 60 %), es necesario realizar análisis complementarios para confirmar la presencia Hb A.
- En los recién nacidos hasta la edad de 6 - 9 meses, se recomienda analizar varias muestras (por ejemplo, obtenidas mensualmente) para controlar la concentración de Hb F. Esto permitirá comprobar la disminución de Hb F y la eventual presencia de una variante. En caso de duda, se aconseja confirmar el resultado con una técnica complementaria y realizar un análisis a los padres.
- Caso en que la hemoglobina F (Hb F) puede estar aumentada (excepto en los recién nacidos):
  - en caso de embarazo;
  - pacientes con drepanocitosis con más de 2 años de edad, tratados con Hydrea® (hidroxicarbamida) y / o transfusionados y / o que presenten naturalmente una cantidad incrementada de Hb F debido a un fenómeno de compensación;
  - pacientes con más de 2 años de edad con el desorden PHHF (persistencia hereditaria de Hb F: hay entre un 20 y un 40 % de Hb F en los heterocigotos);
  - pacientes con más de 2 años de edad que presenten leucemia (de cualquier tipo), anemia hemolítica hereditaria, diabetes, enfermedad tiroidea, hiperactividad de la médula ósea, mieloma múltiple, o un cáncer en fase de metástasis.

  Si desea obtener más información, visite la página web http://www.answers.com/topic/fetal-hemoglobin-test.
- Al analizar sangres de pacientes con drepanocitosis (anemia falciforme) que hayan recibido transfusiones y que presenten un porcentaje bajo de Hb A (< 10 %), la fracción Hb S puede aparecer desplazada de la zona Z5 hacia la zona Z6. Es indispensable confrontar este resultado con el análisis hematológico y realizar análisis complementarios para confirmar la presencia de Hb S.
- Al analizar sangres de pacientes con drepanocitosis antes de una transfusión, puede observarse una variación del porcentaje de la fracción Hb S en los análisis de un mismo paciente debido a la falta de homogeneidad de este tipo de muestra. Se recomienda homogenizar bien este tipo de muestra de sangre antes de analizarla.

## Interferencias y limitaciones

- Vea MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS.
- No use muestras de sangre total no sedimentada.
- No use muestras de sangre antiguas o mal conservadas, ya que la presencia de hemoglobinas degradadas puede observarse en el perfil electroforético en forma de artefactos más o menos numerosos después de 7 días de conservación.
- Si las muestras se han conservado más de 10 días, se observa la presencia de aglomerados viscosos en los glóbulos rojos: es indispensable eliminarlos antes de realizar el análisis.
- Cuando se detecta la presencia de una hemoglobina anormal, se recomienda usar otras técnicas de identificación (por ejemplo, electroforesis de las cadenas de globina) o consultar a un laboratorio especializado para un tipaje preciso de la variante.

  **IMPORTANTE:** Es indispensable realizar el análisis hematológico como resultado complementario.
- La migración de una variante de la hemoglobina con una movilidad muy cercana a la fracción Hb A implica una subestimación de la fracción Hb A y de la variante, por lo que se produce una sobrestimación de la fracción Hb A2. Para obtener una cuantificación correcta de la fracción Hb A2, es necesario eliminar la integración de los picos de la variante y de la Hb A, para integrar conjuntamente esos 2 picos a continuación.
- Las muestras de algunos pacientes que presentan una hemoglobina S homozigota y son tratados con Hydrea® (hidroxicarbamida), pueden presentar una hemoglobina F cuya síntesis ha sido inducida por el tratamiento. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), no se han observado diferencias netas de movilidad entre esta hemoglobina F inducida y la hemoglobina F nativa.
- Teniendo en cuenta los principios analíticos de las técnicas actuales (principios de la electroforesis de zona, resolución), no hay garantías en cuanto a la detección total de todas las variantes de la hemoglobina.

## Resolución de problemas

Contacte con el Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA en caso de que el análisis sea defectuoso.

Las fichas de datos de seguridad de los diferentes reactivos del kit, así como las informaciones relativas a la eliminación de los desechos, están disponibles en el Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA.

## PERFORMANCE DATA

*NOTE : New CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) performance data have not yet been translated into each language of the instructions for use. They are only available in French and English.*
*Each translation will be added in the instructions in the next version of the INSTRUCTIONS & SAFETY DATA SHEETS DVD.*

### Precision

The precision of the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with the CAPILLARYS 2 instrument was evaluated in a study based on the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - USA) EP5-A2 guideline "Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurements Methods".
The means, standard deviations and coefficients of variation (CV's %) (n = 80) were calculated for percentages (%) of hemoglobin fractions for each sample, using statistical tools recommended by CLSI.
The results obtained with the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure indicate a very good reproducibility for quantitative analysis for each hemoglobin component. All electrophoregrams were also interpreted visually.
The results presented below have been obtained using the standard parameters of the CAPILLARYS software (smoothing 0 and hemoglobin fractions automatic quantification with HEMOGLOBIN(E) analysis program).

*Reproducibility between capillaries from the same instrument*

Seven (7) different blood samples were run using the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure in all capillaries of the same CAPILLARYS 2 instrument and with 1 lot of CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) kit. The analyzed blood samples included 2 samples with normal Hb A2 level (No. 1 and 5), 2 samples with increased Hb A2 level (No. 2 and 6), 1 sample with low Hb A2 level (No. 3), 1 pathological sample with Hb F and Hb S (No. 4) and 1 sample with increased Hb F level (No. 7). In this study, each blood sample was analyzed on all capillaries from the same instrument, including 40 runs over 20 working days (at 2 different times of the day). Within each run, samples were analyzed in duplicate.
The results for Hb A, Hb A2, Hb F and Hb S percentages are summarized in the following tables.

| | Sample No. 1 | Sample No. 2 | Sample No. 3 | Sample No. 4 | Sample No. 5 | Sample No. 6 | Sample No. 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mean Hb A % | 97.5 | 96.1 | 98.2 | 49.0 | 97.3 | 93.5 | 33.7 |
| Within-run reproducibility (CV %) | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 0.1 | 0.5 |
| Between-run reproducibility (CV %) | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.1 | 1.1 |
| Between-day reproducibility (CV %) | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.1 | 2.0 |
| Total (CV %) | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 2.3 |

| | Sample No. 1 | Sample No. 2 | Sample No. 3 | Sample No. 4 | Sample No. 5 | Sample No. 6 | Sample No. 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mean Hb A2 % | 2.5 | 3.9 | 1.8 | 2.8 | 2.7 | 6.5 | / |
| Within-run reproducibility (CV %) | 1.5 | 1.0 | 2.3 | 1.5 | 1.7 | 0.9 | / |
| Between-run reproducibility (CV %) | 1.0 | 0.3 | 1.5 | 0.0 | 1.6 | 0.7 | / |
| Between-day reproducibility (CV %) | 0.0 | 0.6 | 0.0 | 0.4 | 1.3 | 0.8 | / |
| Total (CV %) | 1.8 | 1.3 | 2.7 | 1.6 | 2.7 | 1.5 | / |

| | Sample No. 1 | Sample No. 2 | Sample No. 3 | Sample No. 4 | Sample No. 5 | Sample No. 6 | Sample No. 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mean Hb F % | / | / | / | 12.0 | / | / | 65.8 |
| Within-run reproducibility (CV %) | / | / | / | 0.5 | / | / | 0.2 |
| Between-run reproducibility (CV %) | / | / | / | 0.0 | / | / | 0.6 |
| Between-day reproducibility (CV %) | / | / | / | 0.4 | / | / | 1.0 |
| Total (CV %) | / | / | / | 0.6 | / | / | 1.1 |

| | Sample No. 1 | Sample No. 2 | Sample No. 3 | Sample No. 4 | Sample No. 5 | Sample No. 6 | Sample No. 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mean Hb S % | / | / | / | 36.2 | / | / | / |
| Within-run reproducibility (CV %) | / | / | / | 0.2 | / | / | / |
| Between-run reproducibility (CV %) | / | / | / | 0.1 | / | / | / |
| Between-day reproducibility (CV %) | / | / | / | 0.2 | / | / | / |
| Total (CV %) | / | / | / | 0.3 | / | / | / |

*In addition, none of the repeats showed false positive or false negative values.*

*Reproducibility between lots and instruments*

The reproducibility study was conducted using 7 different blood samples that were tested on 3 CAPILLARYS 2 instruments with 3 lots of CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) kits. The analyzed blood samples included 2 samples with normal Hb A2 level (No. 1 and 5), 2 samples with increased Hb A2 level (No. 2 and 6), 1 sample with low Hb A2 level (No. 3), 1 pathological sample with Hb F and Hb S (No. 4) and 1 sample with increased Hb F level (No. 7). In this study, each blood sample was analyzed on all capillaries from the 3 CAPILLARYS 2 instruments, including 60 runs over 26 working days (at 2 different times of the day). Within each run, samples were analyzed in duplicate.

The following table summarizes the total instrument-reagent C.V. % range for the individual hemoglobin Hb A, Hb A2, Hb F and Hb S fractions tested.

| Hemoglobin | Total CV % range |
|---|---|
| Hb A | 0.0 – 3.1 |
| Hb A2 | 0.0 – 3.7 |
| Hb F | 0.3 – 1.5 |
| Hb S | 0.3 – 0.6 |

## Linearity

The linearity of the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with the CAPILLARYS 2 instrument was evaluated in a study based on the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - USA) EP6-A guideline "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A statistical Approach".

The results for percentages (%) of hemoglobin fractions were analyzed using statistical tools recommended by CLSI.

*Hb A2 linearity*

One Hb A2 enriched blood sample (containing 13.2 g/dL total hemoglobin with 9.9 % Hb A2) was mixed with a Hb A2 depleted blood sample (containing 13.4 g/dL total hemoglobin with 0.0 % Hb A2) within different proportions and the dilutions were electrophoresed with CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 instrument.

The CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 instrument gave a good linearity for Hb A and Hb A2 within the entire range studied, with a maximum of about 1.3 g/dL for Hb A2 in the analyzed sample (**between 0.0 and 9.9 % of Hb A2**).

*Hb F linearity*

One umbilical cord blood sample (containing 16.8 g/dL total hemoglobin with 87.8 % Hb F) was mixed with a normal blood sample (containing 10.8 g/dL total hemoglobin with 0.0 % Hb F) within different proportions and the dilutions were electrophoresed with CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 instrument.

The CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 instrument gave a good linearity for Hb A and Hb F within the entire range studied, with a maximum of about 14.7 g/dL for Hb F in the analyzed sample (**between 0.0 and 87.8 % of Hb F**).

*Hb S linearity*

One blood sample with Hb S (containing 8.9 g/dL total hemoglobin with 71.3 % Hb S and 0.0 % Hb A) was mixed with a normal blood sample (containing 14.4 g/dL total hemoglobin with 0.0 % Hb S and 97.4 % Hb A) within different proportions and the dilutions were electrophoresed with CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 instrument.

The CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 instrument gave a good linearity for Hb S within the entire range studied, with a maximum of about 6.3 g/dL for Hb S in the analyzed sample (**between 0.0 and 71.3 % of Hb S**) and a good linearity for Hb A within the entire range studied, with a maximum of about 14.0 g/dL for Hb A in the analyzed sample (**between 0.0 and 97.4 % of Hb A**).

*Hb C linearity*

One blood sample with Hb C (containing 27.8 g/dL total hemoglobin with 30.0 % Hb C) was mixed with a normal blood sample (containing 25.4 g/dL total hemoglobin with 0.0 % Hb C) within different proportions and the dilutions were electrophoresed with CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 instrument.

The CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 instrument gave a good linearity for Hb C within the entire range studied, with a maximum of about 8.3 g/dL for Hb C in the analyzed sample (**between 0.0 and 30.0 % of Hb C**).

*Hb D linearity*

One blood sample with Hb D (containing 24.6 g/dL total hemoglobin with 39.4 % Hb D) was mixed with a normal blood sample (containing 30.5 g/dL total hemoglobin with 0.0 % Hb D) within different proportions and the dilutions were electrophoresed with CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 instrument.

The CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 instrument gave a good linearity for Hb D within the entire range studied, with a maximum of about 9.7 g/dL for Hb D in the analyzed sample (**between 0.0 and 39.4 % of Hb D**).

*Hb E linearity*

One blood sample with Hb E (containing 10.8 g/dL total hemoglobin with 95.4 % Hb E) was mixed with a normal blood sample (containing 12.3 g/dL total hemoglobin with 0.0 % Hb E) within different proportions and the dilutions were electrophoresed with CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 instrument.

The CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 instrument gave a good linearity for Hb E within the entire range studied, with a maximum of about 10.3 g/dL for Hb E in the analyzed sample (**between 0.0 and 95.4 % of Hb E**).

## Accuracy – Internal correlation

The internal concordance study of the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with the CAPILLARYS 2 instrument was evaluated in a study based on the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - USA) EP09-A2 guideline "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline – Second Edition (Interim Revision)".

The results for percentages (%) of hemoglobin fractions were analyzed using statistical tools recommended by CLSI.

*NOTE: The results presented below have been obtained from 1 internal accuracy study that has been performed in SEBIA facility. The analyzed blood samples and their diagnostic assessment were provided by 11 hospital laboratories in France and USA. The diagnosis was based on a routine HPLC procedure.*

The levels of hemoglobin fractions were measured in 56 blood samples, including 20 samples with hemoglobin variants such as hemoglobins S, C, D and E, both by electrophoretic separations obtained with the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure with the CAPILLARYS 2 instrument and a commercially available HPLC system for hemoglobins analysis.
The measured values of hemoglobin fractions from both procedures were analyzed by a linear regression statistical procedure. The results of linear regression analysis for Hb A, Hb A2, Hb F and Hb S are tabulated below (y = CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) with CAPILLARYS 2 instrument) :

| Hb fraction | Number of samples | Correlation coefficient | y-Intercept | Slope | Range of Hb % values CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) with CAPILLARYS 2 instrument |
|---|---|---|---|---|---|
| Hb A | 56 | 0.995 | - 11.24 | 1.32 | 20.9 – 98.1 |
| Hb A2 | 44 | 0.977 | - 0.07 | 1.13 | 0.1 – 6.2 |
| Hb F | 56 | 1.000 | - 0.35 | 0.93 | 0.0 – 79.0 |
| Hb S | 8 | 0.997 | - 0.39 | 1.07 | 6.5 – 40.9 |

All abnormal hemoglobins or abnormal levels of normal hemoglobins detected with the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with the CAPILLARYS 2 instrument were in agreement with the comparative HPLC system. There was no case observed of false positive, i.e., detection of an abnormal band or abnormal level of a normal band where no such abnormality existed.

## Accuracy – External correlations

*NOTE: The results presented below have been obtained from 2 external accuracy studies that have been performed in 2 hospital laboratories located in the USA. The diagnosis was based on a routine HPLC procedure.*

In study No. 1, the levels of hemoglobin fractions were measured in 123 blood samples, including 33 samples with hemoglobin variants such as hemoglobins S, C and E, both by electrophoretic separations obtained with the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure with the CAPILLARYS 2 instrument and a commercially available HPLC system for hemoglobins analysis.
The measured values of hemoglobin fractions from both procedures were analyzed by a linear regression statistical procedure. The results of linear regression analysis for Hb A, Hb A2, Hb F, Hb S and Hb C are tabulated below (y = CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) with CAPILLARYS 2 instrument) :

| Hb fraction | Number of samples | Correlation coefficient | y-Intercept | Slope | Range of Hb % values CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) with CAPILLARYS 2 instrument |
|---|---|---|---|---|---|
| Hb A | 121 | 0.999 | - 1.72 | 1.14 | 0.0 – 98.8 |
| Hb A2 | 93 | 0.983 | - 0.21 | 1.12 | 1.0 – 6.6 |
| Hb F | 103 | 0.995 | - 0.62 | 0.99 | 0.0 – 90.0 |
| Hb S | 26 | 0.988 | 1.57 | 0.99 | 14.7 – 54.9 |
| Hb C | 5 | 0.999 | - 0.42 | 0.99 | 10.0 – 43.7 |

All abnormal hemoglobins or abnormal levels of normal hemoglobins detected with the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with the CAPILLARYS 2 instrument were in agreement with the comparative HPLC system. There was no case observed of false positive, i.e., detection of an abnormal band or abnormal level of a normal band where no such abnormality existed.

In study No. 2, the levels of hemoglobin fractions were measured in 183 blood samples, including 83 samples with hemoglobin variants such as hemoglobins S, C and D, both by electrophoretic separations obtained with the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure with the CAPILLARYS 2 instrument and a commercially available HPLC system for hemoglobins analysis.
The measured values of hemoglobin fractions from both procedures were analyzed by a linear regression statistical procedure. The results of linear regression analysis for Hb A, Hb A2, Hb F, Hb S, Hb C and Hb D are tabulated below (y = CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) with CAPILLARYS 2 instrument) :

| Hb fraction | Number of samples | Correlation coefficient | y-Intercept | Slope | Range of Hb % values CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) with CAPILLARYS 2 instrument |
|---|---|---|---|---|---|
| Hb A | 180 | 0.991 | - 1.75 | 1.13 | 0.0 – 98.2 |
| Hb A2 | 113 | 0.925 | - 0.14 | 1.02 | 0.4 – 6.0 |
| Hb F | 181 | 0.991 | 0.13 | 1.06 | 0.0 – 98.0 |
| Hb S | 67 | 0.994 | 2.49 | 0.97 | 7.4 – 93.6 |
| Hb C | 13 | 0.985 | 1.29 | 0.92 | 12.8 – 45.3 |
| Hb D | 3 | 0.984 | 0.72 | 1.07 | 34.5 – 41.1 |

All abnormal hemoglobins or abnormal levels of normal hemoglobins detected with the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with the CAPILLARYS 2 instrument were in agreement with the comparative HPLC system. There was no case observed of false positive, i.e., detection of an abnormal band or abnormal level of a normal band where no such abnormality existed.

sebia

# CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)

Ref. 2007

## CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING

IVD

CE

2012/06

# TÉCNICA CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) EN EL SISTEMA CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING

## UTILIZACIÓN

La técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) realizada con el sistema automático CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING permite la separación en medio alcalino (pH 9,4) de las hemoglobinas normales de la sangre humana (A, F y A2) y la detección de las principales hemoglobinas anormales (especialmente las hemoglobinas S, C, E y D) mediante electroforesis capilar, a partir de sangre total obtenida con anticoagulante que contenga EDTA.
El sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING permite realizar todas las etapas de la electroforesis hasta la obtención del perfil de las hemoglobinas para el análisis cualitativo o cuantitativo. El análisis se realiza en el hemolisado de glóbulos rojos de sangre total.
Las hemoglobinas, separadas en capilares de sílice fundido, son detectadas directamente en una burbuja existente en el capilar mediante espectrofotometría de absorbancia a 415 nm, que es la longitud de onda de absorción específica de las hemoglobinas.
Los perfiles electroforéticos son analizados visualmente para detectar las anomalías. La detección directa proporciona automáticamente una cuantificación relativa precisa de cada fracción individual de las hemoglobinas que presenta un interés particular, como la hemoglobina A2 para el diagnóstico de las ß talasemias. Además, la buena separación de las diferentes fracciones permite confirmar la identificación de las variantes de la hemoglobina, y en particular, diferenciar la hemoglobina S de la hemoglobina D, y la hemoglobina E de la hemoglobina C.
La cuantificación de la hemoglobina A2 también se puede realizar en presencia de hemoglobina E.

Para uso en diagnóstico *In Vitro*.

**Esta técnica debe realizarse con los reactivos del kit CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E).**

## PRINCIPIO DEL TEST

La hemoglobina es una molécula compleja compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, idénticas dos a dos, estando cada cadena ligada al hemo, que es un núcleo tetrapirrólico (porfirina) ligado a un átomo de hierro. El hemo es común a todas las hemoglobinas. La parte proteica responsable del tipo de hemoglobina se denomina globina. Se conocen principalmente las cadenas polipeptídicas α, ß, δ y γ. En humanos podemos encontrar las hemoglobinas normales siguientes :

- Hemoglobina A........................................... = α2 ß2
- Hemoglobina A2......................................... = α2 δ2
- Hemoglobina fetal F................................... = α2 γ2

La cadena α es común a estas tres hemoglobinas.

La estructura espacial de la hemoglobina (como la del resto de proteínas) depende de la naturaleza y la secuencia de los aminoácidos que forman las cadenas. Las uniones que se forman entre los diferentes aminoácidos son responsables de la forma de la molécula, de su estabilidad y de sus propiedades. Situadas en un campo eléctrico, las hemoglobinas se desplazan en función de su carga, del tamaño de la molécula, de la fuerza iónica, del pH del tampón y de la naturaleza del soporte empleado. Las variantes de la hemoglobina son debidas a mutaciones de algunos aminoácidos que implican cargas de superficie diferentes en la hemoglobina y, por consiguiente, movilidades diferentes en la electroforesis.
Las anomalías de la hemoglobina son de dos tipos :

- anomalías cualitativas o estructurales, denominadas hemoglobinopatías ;
- anomalías cuantitativas o de regulación, denominadas talasemias.

La electroforesis de las hemoglobinas de la sangre humana es un análisis muy útil en el laboratorio de análisis clínicos para investigar las anomalías cualitativas y cuantitativas de la hemoglobina. Paralelamente a las técnicas de electroforesis en diferentes soportes, entre los que está el gel de agarosa, se ha desarrollado la técnica de electroforesis capilar, que ofrece las ventajas de una automatización completa del análisis, separaciones rápidas y una resolución excelente. Se define como una técnica de separación electrocinética realizada en un tubo de diámetro interno inferior a 100 $\mu$m lleno de un tampón compuesto por electrolitos. Se considera una tecnología intermedia entre la electroforesis de zona en soporte y la cromatografía líquida.
El sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING usa el principio de la electroforesis capilar en solución libre, que representa la forma más corriente de electroforesis capilar. Permite la separación de moléculas cargadas en función de su movilidad electroforética propia en un tampón de pH dado, y, según el pH del electrolito, de un flujo electroendosmótico más o menos importante. El sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING posee una serie de capilares en paralelo, permitiendo realizar 8 análisis simultáneos a partir de sangre total. En este sistema, la inyección en los capilares de las muestras diluidas con la solución hemolisante se realiza en el ánodo por aspiración. La separación se realiza a continuación aplicando una diferencia de potencial de varios miles de voltios en los extremos de cada capilar. La detección directa de las hemoglobinas se efectúa a 415 nm en el lado catódico. Los capilares se lavan antes de cada análisis con una solución de lavado, y luego con el tampón de análisis. Con el tampón de pH alcalino usado, el orden de migración de las principales hemoglobinas normales y anormales es el siguiente, del cátodo al ánodo: δA'2 (variante de A2), C, A2/O-Arab, E, S, D, G-Filadelfia, F, A, Hope, Bart, J, N-Baltimore y H. Hay que tener en cuenta que la anhidrasa carbónica no se detecta en el perfil electroforético de las hemoglobinas en la electroforesis capilar, lo que permite identificar algunas variantes de la hemoglobina A2 en su zona de migración.

## REACTIVOS SUMINISTRADOS EN EL KIT CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)

*Ver la parte anterior «TÉCNICA CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) EN EL SISTEMA CAPILLARYS 2».*

## REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

***ATENCIÓN : Ver las fichas de datos de seguridad.***

### 1. CONTROL Hb A2 NORMAL

#### Composición

El Control Hb A2 Normal (SEBIA, referencia N° 4778) se obtiene a partir de una mezcla de sangres humanas normales. Un procedimiento de estabilización permite conservar el Control Hb A2 Normal en forma liofilizada.

#### Aplicación

El Control Hb A2 Normal está destinado al control de la migración antes de realizar una nueva serie de análisis, después de analizar 10 cargadores sucesivos y al final de la serie de análisis, así como al control de calidad del método de determinación de la hemoglobina humana A2 mediante la técnica electroforética CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) en el sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING.
Reconstituya, con precisión, cada vial liofilizado de Control Hb A2 Normal con el volumen de agua destilada o desionizada indicado en las instrucciones del Control Hb A2 Normal. Déjelo en reposo 30 minutos y después agítelo suavemente (evite la formación de espuma).

<u>Control de migración</u> :

**IMPORTANTE:** Para un uso óptimo del Control Hb A2 Normal en el CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING, es indispensable usar un tubo específico previsto a este efecto y su tapón correspondiente (ver «EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS», Tubos y tapones para Controles) e identificar ese tubo con una etiqueta con el código de barras del Control Hb A2 Normal.

El Control Hb A2 Normal debe ser usado de la forma siguiente :

- Dispense el Control Hb A2 Normal reconstituido en un tubo para control previsto a este efecto.
- Cierre el tubo con su tapón.
- Coloque un adaptador para el tubo de control en la posición 1 del cargador específico n° 0 del CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING previsto a este efecto, equipado con un segmento de dilución verde nuevo.
- Ponga el tubo con el Control Hb A2 Normal (identificado con la etiqueta con el código de barras del Control Hb A2 Normal) en el adaptador situado en el cargador n° 0.
- Inicie el análisis : Introduzca el cargador n° 0 en el sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING, seleccione « Dilución automática » en la ventana que aparecerá en pantalla y valide.
- **Después de cada cambio del contenedor del tampón de análisis (incluso si el lote no cambia) o de modo de trabajo, después de un ciclo de limpieza con CAPICLEAN, después de una actualización del programa o de una activación de los capilares**, realice una segunda serie de análisis con este control, volviendo a introducir inmediatamente el mismo cargador n° 0 con el mismo segmento de dilución, que contiene el Control Hb A2 Normal diluido en el primer análisis, y un tubo para control vacío identificado con la etiqueta con el código de barras del Control Hb A2 Normal en la posición 1. En la ventana que aparecerá en pantalla denominada «Control Hb A2 Normal», seleccione «Dilución manual» y valide.

Los resultados obtenidos son entonces tenidos en cuenta automáticamente por el programa para el análisis de los resultados.

**IMPORTANTE :** El pico de la hemoglobina A del Control Hb A2 Normal debe presentar una densidad óptica (DO) mínima de 0,10. Por debajo de este valor, el centrado del perfil electroforético no puede realizarse correctamente. Durante el análisis de las muestras, la identificación de las fracciones de la hemoglobina Hb A, Hb F, Hb A2 y Hb C, así como la determinación de la zona de migración del resto de variantes pueden ser entonces imposibles o erróneas (ver el párrafo ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS).

**IMPORTANTE :** Para un uso óptimo del Control Hb A2 Normal, es indispensable usar una etiqueta con código de barras, destinada a identificar el tubo para control que contenga el Control Hb A2 (cierre el tubo con su tapón específico al usarlo).

*NOTAS : Al usar por primera vez el programa de análisis «HEMOGLOBIN(E)» en el automático para electroforesis CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING o después de un paro prolongado (más de una semana), se recomienda realizar 3 series de análisis sucesivas con el Control Hb A2 Normal.*

*Después de instalar el instrumento automático CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING, al realizar la primera serie de análisis de sangres, aparecerá un símbolo de alerta rojo en caso de ausencia de hemoglobina A en una de las muestras (que indica que no es posible centrar el perfil, ver el párrafo «Análisis de los resultados»).*

*Se aconseja entonces analizar una muestra que contenga hemoglobina A en el capilar afectado y volver a analizar la muestra sin hemoglobina A colocándola en un capilar que ya haya detectado la presencia de hemoglobina A.*

**<u>Control de calidad</u>** : El Control Hb A2 Normal debe ser usado como una sangre humana normal. Después de la reconstitución, use directamente el Control Hb A2 Normal como una muestra de sangre a analizar o como control de la migración (dispensado en un tubo para control con tapón, identificado con una etiqueta con código de barras y analizado con el cargador n° 0 usando el adaptador, ver el párrafo anterior). Será tratado automáticamente con la solución hemolisante. Se recomienda incluir el Control Hb A2 Normal en cada serie de análisis. Los valores obtenidos deben estar comprendidos entre los valores específicos de cada lote.

**IMPORTANTE :** Para un uso óptimo del Control Hb A2 Normal colocado en un cargador cualquiera, es indispensable usar una etiqueta con código de barras, destinada a identificar el tubo para control que contenga el Control Hb A2 (cierre el tubo con su tapón específico al usarlo, y colóquelo en el adaptador situado en el cargador).

<u>Uso de un adaptador de tubos cónicos para los controles</u> :
Este adaptador sirve para sostener los tubos cónicos para sangres de control en un cargador n° 0 ó en un cargador para muestras del sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING. Tiene 2 marcas que permiten estimar el volumen de sangre de control disponible para realizar el análisis :

- cuando el tubo está insertado en el adaptador, la marca superior está situada a la altura de la parte superior del adaptador y corresponde a un volumen de unos 250 $\mu$L de sangre de control en el tubo. Si el volumen de la sangre de control alcanza este nivel o lo supera, es suficiente para realizar el análisis completo de esa sangre de control con el cargador n° 0.
- cuando el tubo está insertado en el adaptador, la marca inferior está situada a la altura de la parte baja del hueco y corresponde a un volumen de unos 100 $\mu$L de sangre de control en el tubo. Si le volumen de la sangre de control alcanza este nivel o está comprendido entre las 2 marcas del adaptador, es suficiente para realizar un análisis de esa sangre de control en un cargador para muestras.

### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

*Vea las instrucciones de uso del Control Hb A2 Normal.*

*NOTA : Para un uso óptimo en el CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING, se recomienda repartir el Control en 4 alícuotas de 400 µL en microtubos antes de congelarlo.*

Como ninguna prueba de análisis puede probar la ausencia de los virus VIH, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C o de cualquier otro agente infeccioso, el Control Hb A2 Normal debe ser manipulado con las precauciones habituales para evitar contaminarse.
Esta sangre de control, analizada usando técnicas autorizadas por una autoridad competente (FDA, ANSM…), es negativa :

- para la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B,
- para la presencia de anticuerpos anti-VHC,
- para la presencia de anticuerpos anti-VIH 1 y anti-VIH 2.

## 2. AGUA DESTILADA O DESIONIZADA

### Uso

Para lavar los capilares del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING, SEBIA.
Se recomienda usar agua destilada o desionizada filtrada (con un filtro de porosidad ≤ 0,45 µm).
Renueve el agua cada día para evitar contaminaciones microbianas. En caso de conservación prolongada, añada 350 µL/L de CLEAN PROTECT (SEBIA, referencia n° 2059 : 1 vial de 5 mL).

**IMPORTANTE :** Antes de llenar el contenedor de agua, se recomienda lavarlo con agua destilada o desionizada en abundancia.

## 3. CAPICLEAN

### Presentación

El vial de solución enzimática concentrada CAPICLEAN (SEBIA, referencia n° 2058: 1 vial de 25 mL) contiene: enzimas proteolíticos, surfactantes y componentes inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

***ATENCIÓN: Ver la ficha de datos de seguridad.***

### Uso

Para la limpieza de la cánula de muestras del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING, SEBIA, durante el ciclo de limpieza CAPICLEAN.

**IMPORTANTE :** Realice un ciclo de limpieza con CAPICLEAN al menos una vez por semana y, como máximo, una vez al día, o cada 500 análisis cuando se hayan realizado en menos de una semana.

*Ver las instrucciones del CAPICLEAN, SEBIA.*

**IMPORTANTE :** No reutilice el segmento de dilución tras la limpieza de la cánula.

### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

CAPICLEAN debe conservarse en nevera (entre 2 y 8 °C). Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. NO CONGELAR.
Pueden observarse un precipitado o partículas agregadas en suspensión (flóculos) en el vial del CAPICLEAN sin que su funcionamiento se vea afectado.
No resuspenda el precipitado o las partículas. Se recomienda pipetear sólo el sobrenadante.

## 4. SOLUCIÓN DE HIPOCLORITO DE SODIO (para la limpieza de la cánula de muestras)

### Preparación

Prepare una solución de hipoclorito de sodio (lejía) con un 2 a 3 % de cloro a partir de una dosis concentrada de 250 mL con 9,6 % de cloro diluida hasta 1 litro (volumen final) con agua destilada o desionizada fría.

### Uso

Para la limpieza de la cánula de muestras del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING, SEBIA (mantenimiento semanal para eliminar cualquier proteína que se haya adsorbido a la cánula).

*Ver el manual de instrucciones del CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING, SEBIA.*

- Use el cargador de muestras específico para el mantenimiento (n° 100).
- Coloque en este cargador, en la posición 1, un tubo de hemólisis que contenga 2 mL de la solución de hipoclorito de sodio preparada anteriormente.
- Introduzca el cargador n° 100 de mantenimiento en el sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING.
- En el menú de la ventana "MANTENIMIENTO" que aparecerá en pantalla, seleccione la opción "Iniciar la limpieza de la cánula (solución de hipoclorito de sodio)", y luego valide.

### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

La solución de hipoclorito de sodio diluida puede conservarse 3 meses a temperatura ambiente en un recipiente de plástico cerrado herméticamente, protegido de la luz solar y de cualquier fuente de calor o ignición, y alejado de ácidos y de amoniaco.

## 5. SOLUCIÓN DE LAVADO CAPILLARYS / MINICAP

### Preparación

El vial de la solución de lavado concentrada (SEBIA, referencia n° 2052 : 2 viales de 75 mL) debe completarse hasta 750 mL con agua destilada o desionizada.
Después de la dilución, la solución de lavado contiene una solución alcalina pH ≈ 12.

### Uso

Para el lavado de los capilares del CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING. Reactivo adicional necesario en caso de realizar series inferiores a 40 análisis.

**IMPORTANTE :** Antes de llenar el vial de solución de lavado, se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el cuello del contenedor, el tapón-conector y el tubo para evitar la acumulación de sales.

### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Las soluciones de lavado concentrada y diluida deben conservarse a temperatura ambiente o en nevera en contenedores cerrados para evitar la evaporación. La solución concentrada es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial.
La solución diluida es estable durante 3 meses.
Deseche la solución de lavado diluida si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana.

### 6. SALINA

#### Preparación

Solución de NaCl 0,15 M (9 g/L) en agua destilada o desionizada.

#### Uso

Para lavar los glóbulos rojos antes de conservarlos a - 80 °C, si es necesario.

#### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

La solución salina puede conservarse a temperatura ambiente o en nevera.
Deseche la solución al cabo de 3 meses o si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana. Para una conservación prolongada, añada 1 g/L de azida sódica.

*NOTAS :*

*Las pruebas realizadas durante la validación de los reactivos muestran que, para las diferentes soluciones y usando material adaptado al volumen a reconstituir, una variación del volumen final de un ± 5 % no tiene ningún efecto adverso en el análisis.*
*El agua destilada o desionizada, usada para la reconstitución de las soluciones, debe estar exenta de contaminación bacteriana o fúngica (use un filtro de 0,22 µm) y debe tener una resistividad superior a 10 Megohms x cm.*

## EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS

1. Sistema de electroforesis capilar CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING SEBIA, referencia n° 1227.
2. Cargadores, suministrados con el sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING.
3. Cargadores CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING para tubos de 11 mm, SEBIA, referencia nº 1360, 5 unidades.
4. Contenedores de plástico suministrados con el sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING : contenedor para la limpieza de los capilares (debe llenarse con agua destilada o desionizada), contenedor de solución de lavado y contenedor de desechos.
5. Tubos de extracción de 13 mm de diámetro con los tapones correspondientes (altura máxima del tubo tapado : 90 mm, diámetro máximo del tapón : 17 mm) : por ejemplo, tubos de 13 x 75 mm, BD Vacutainer, Terumo Venosafe 5 mL, Greiner Bio-one Vacuette 1, 2, 3 ó 4 mL, ó Sarstedt S-Monovette 4 mL,
   ó
   tubos de extracción de 11 mm de diámetro con los tapones correspondientes (altura máxima del tubo tapado : 90 mm, diámetro máximo del tapón : 17 mm) : por ejemplo, tubos de 11 x 66 mm, Sarstedt S-Monovette 2,7 mL ó Kabe Labortechnik Primavette S 2,6 mL,
   o cualquier tubo de extracción de dimensiones equivalentes homologado para su uso en análisis clínicos.
6. Tubos y tapones para Controles, SEBIA, referencia n° 9205 : 500 tubos cónicos y tapones para el uso de sangres control en el sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING.
7. Adaptadores para los tubos de los controles SEBIA, referencia n° 9203, 10 unidades (o suministrados con el sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING).

## MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS

#### Extracción y conservación de las muestras

El análisis se realiza con muestras frescas de sangre total recogidas con anticoagulante que contenga EDTA. No use anticoagulantes que contengan yodoacetato. Las sangres deben ser obtenidas según los métodos establecidos de uso en el laboratorio clínico.
Las sangres pueden conservarse un máximo de siete días en nevera (entre 2 y 8 °C).
*NOTA : No conserve las sangres a temperatura ambiente. No las congele directamente a - 80 °C.*

Las hemoglobinas (Hb) de las muestras conservadas en nevera (entre 2 y 8 °C) se degradan progresivamente.
En una muestra conservada más de 7 días en nevera :

- como consecuencia de la degradación de la muestra, aparece una fracción débil, correspondiente a metahemoglobina, en la zona de migración de la Hb S,
- en presencia de Hb C, aparece una fracción correspondiente a la Hb C degradada en posición anódica respecto a la Hb A2, pero sin ninguna interferencia con ésta (zona Z4, ver la tabla del párrafo «Interpretación»),
- en presencia de Hb O-Arab, aparece una fracción correspondiente a la Hb O-Arab degradada en la zona de migración de la Hb S (zona Z5, ver la tabla del párrafo «Interpretación»),
- en presencia de Hb E, aparece una fracción correspondiente a la Hb E degradada en la zona Z6 (ver la tabla del párrafo « Interpretación»),
- en presencia de Hb S, aparece una fracción correspondiente a la Hb S degradada en la zona de migración de la Hb F (zona Z7, ver la tabla del párrafo « Interpretación»),
- en presencia de Hb A, aparece una fracción correspondiente a la Hb A degradada en posición anódica respecto a la Hb A (zona Z11, ver la tabla del párrafo « Interpretación»).

En presencia de Hb F (en el caso de sangres de recién nacidos), aparece una fracción en la zona de migración de la Hb A (zona Z9, ver la tabla del párrafo « Interpretación») como consecuencia de la degradación de la muestra.
Si la muestra se ha conservado más de 10 días en nevera, se observa la presencia de aglomerados viscosos en los glóbulos rojos : es indispensable eliminarlos antes de realizar el análisis.

Para conservaciones prolongadas, congele rápidamente las muestras a - 80 °C (como máximo durante las 8 horas siguientes a su obtención) después de haber lavado los glóbulos rojos según el procedimiento siguiente : Centrifugue la sangre total, durante 5 minutos a 5 000 r.p.m.; deseche el plasma ; lave 2 veces los glóbulos rojos con 10 volúmenes de salina (centrifugue después de cada lavado) y elimine el exceso de salina de la superficie del coágulo globular lavado; agite en el vortex antes de congelarlo.
Las sangres congeladas a - 80 °C son estables un máximo de 3 meses.

**IMPORTANTE :** Para una conservación óptima de las muestras, no las conserve a - 20 °C sino a - 80 °C (ver la BIBLIOGRAFÍA : J Bardakdjian-Michau *et al*, 2003).

### Preparación de las muestras

- Use directamente las muestras de sangre total.
- Compruebe que todos los tubos contengan al menos 1 mL de sangre y que estén bien tapados.
- **Agite en el vortex durante 5 segundos las sangres que hayan sido conservadas en nevera (2 - 8 °C) durante 1 semana.**

***ATENCIÓN : Los tubos deben estar tapados con sus tapones correspondientes adaptados a la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) en el CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING (ver EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS).***

Casos especiales :

*Análisis de muestras sin Hb A ó Hb A2 (estas muestras pueden ser cuantificadas pero no caracterizadas mediante las zonas de identificación) :*
Para identificar las fracciones de la hemoglobina presentes en una muestra sin hemoglobina A o hemoglobina A2, se recomienda preparar la muestra según el método siguiente:
- Agite en el vortex el tubo de sangre total durante 5 segundos.
- En un tubo cónico para control, mezcle un volumen (50 µL) de la sangre total a analizar y un volumen (50 µL) del Control Hb A2 Normal y tape el tubo.
- Agite en el vortex durante 5 segundos.
- Coloque el tubo con un adaptador para los tubos de controles en un cargador del CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING.
- Introduzca el cargador en el sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING.
- Realice el análisis de la muestra según el procedimiento habitual.

Los resultados obtenidos son entonces tenidos en cuenta automáticamente por el programa para el análisis de los resultados.

**IMPORTANTE:** En una muestra sin Hb A ó Hb A2 preparada según este método, la cuantificación de las fracciones indicada en el perfil electroforético no tiene ningún significado y los valores obtenidos no deben ser tenidos en cuenta; este procedimiento sólo permite la identificación de la o las variantes de la hemoglobina presentes en la muestra mediante las zonas de identificación, gracias a que migrarán en la zona correcta.

La cuantificación de las fracciones se obtiene en este caso analizando la muestra inicial no mezclada (antes de diluirla con la sangre control).

*Análisis de una muestra con una fracción adicional en las zonas de migración Z2 (zona de migración de la Hb C) ó Z3 (zona de migración de la Hb A2) :*
La presencia de la variante Hb Constant Spring puede sospecharse en caso de analizar una muestra que presente una fracción de la hemoglobina que migre en las zonas de migración Z2 ó Z3. Esta fracción también puede ser debida a la presencia de proteínas plasmáticas en la muestra (por ejemplo, en una muestra de paciente anémico, con un cociente [glóbulos rojos] / [plasma] disminuido). El análisis de los glóbulos rojos de la muestra, sin proteínas plasmáticas, permitirá confirmar la presencia de esta variante.
Para ello, prepare esta muestra según el método siguiente :
- Centrifugue la sangre total durante 5 minutos a 5.000 r.p.m. y deseche el plasma.
- En un microtubo, mezcle un volumen (50 µL) de glóbulos rojos y 8 volúmenes (400 µL) de solución hemolisante CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E).
- Agite en el vortex durante 5 segundos.
- Dispense 100 µL del hemolisado preparado en los pocillos de un segmento de dilución verde nuevo.
- Ponga este segmento es el cargador nº 0 del CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING.
- Introduzca el cargador en el sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING, seleccione en la ventana que aparecerá en pantalla «Sample» en «dilución manual» y valide.

Los resultados obtenidos son entonces tenidos en cuenta automáticamente por el programa para el análisis de los resultados.

*Análisis de muestras conservadas a - 80 °C :*
Para analizar una muestra conservada a - 80 °C, prepare esa muestra según el método siguiente :
- Agite en el vortex el tubo de glóbulos rojos descongelados durante 5 segundos.
- En un microtubo, mezcle un volumen (50 µL) de glóbulos rojos y 8 volúmenes (400 µL) de solución hemolisante CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E).
- Agite en el vortex durante 5 segundos.
- Dispense 100 µL del hemolisado preparado en un pocillo de un segmento de dilución verde nuevo.
- Ponga este segmento en el cargador nº 0 del CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING.
- Introduzca el cargador en el sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING, seleccione en la ventana que aparecerá en pantalla «Sample» en «dilución manual» y valide.

Los resultados obtenidos son entonces tenidos en cuenta automáticamente por el programa para el análisis de los resultados.

*Análisis de muestras cuyo volumen es inferior a 1 mL :*
- Agite en el vortex el tubo de sangre total durante 5 segundos.
- Dispense 100 µL de la sangre total a analizar en un tubo cónico para control y tape el tubo.
- Coloque el tubo con un adaptador para los tubos de controles en un cargador del CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING.
- Introduzca el cargador en el sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING al principio de una serie de análisis.
- Realice el análisis de la muestra según el procedimiento habitual.

*NOTA : En ausencia de código de barras en el tubo cónico, la muestra no es identificada automáticamente.*

### Muestras a descartar

- No use muestras en las que haya comenzado la coagulación.
- No use muestras de sangre antiguas o mal conservadas, ya que la hemólisis automática de las muestras puede ser perturbada por la presencia de aglomerados viscosos entre los glóbulos rojos; el perfil electroforético también puede ser afectado por lo productos de degradación de las hemoglobinas (o por artefactos).

En estos 2 casos, la presencia de aglomerados de glóbulos rojos puede impedir la toma de la muestra.

- No use directamente un tubo que contenga menos de 1 mL de muestra de sangre a analizar, ya que el análisis puede verse afectado (ver casos especiales).

## PROCEDIMIENTO

El sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING es un instrumento multiparamétrico automático que permite realizar el análisis de las hemoglobinas en 8 capilares en paralelo según las etapas siguientes :

- lectura de los códigos de barras de los tubos primarios (hasta 8) y del cargador;
- agitación de las muestras antes del análisis;
- hemólisis y dilución de las muestras a partir de los tubos primarios;
- lavado de los capilares;
- inyección de las muestras hemolisadas;
- separación y detección directa de las hemoglobinas en los capilares.

Las etapas manuales son las siguientes :

- colocación de los tubos primarios (tapados) en los cargadores, en las posiciones 1 a 8;
- colocación de un segmento de dilución nuevo en el cargador;
- introducción en el sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING;
- recuperación de los cargadores después del análisis.

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING.

### I. PREPARACIÓN DEL ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

1. Encienda el CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING y el ordenador de control.
2. Abra el programa de gestión PHORESIS y valide el nivel de los reactivos, tras lo cual el aparato se iniciará automáticamente.
3. Use el kit CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) con el programa de análisis «HEMOGLOBIN(E)». Para seleccionar el programa de análisis «HEMOGLOBIN(E)» y conectar los contenedores de tampón y de solución hemolisante CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) al aparato, lea detenidamente el manual de instrucciones del CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING.
4. El cargador de muestras posee 8 posiciones para tubos. Coloque hasta 8 tubos primarios de sangre total tapados en cada cargador (posiciones 1 a 8), de forma que el código de barras de cada tubo quede encarado hacia la ventana de lectura.

   **IMPORTANTE:** Si el número de tubos a analizar es inferior a 8, complete el cargador con tubos tapados que contengan agua destilada o desionizada.
5. Ponga un segmento de dilución nuevo en cada cargador. En caso de ausencia del segmento, el cargador será expulsado.
6. Introduzca el (o los) cargador(es) completo(s) en el sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING por el orificio de entrada situado en medio del aparato. Se pueden introducir hasta trece cargadores a la vez, pudiéndose introducir nuevos cargadores de forma continua a medida que se vaya completando el análisis de los cargadores ya introducidos. Cuando quiera analizar una sangre control, use el cargador específico nº 0, los tubos y tapones previstos a este efecto y el adaptador para tubos de controles.
7. Saque de la cinta de salida, situada a la izquierda del aparato, los cargadores ya analizados.
8. Coja con precaución el segmento de dilución usado y deséchelo.

   ***ATENCIÓN : Manipule con cuidado los segmentos de dilución que contengan muestras biológicas.***

### DILUCIÓN - MIGRACIÓN - DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

1. Lectura de los códigos de barras de los tubos primarios de muestra y del cargador.
2. Agitación de los tubos.
3. Dilución de las sangres con la solución hemolisante, con limpieza de la cánula de muestras entre cada dilución.
4. Lavado de los capilares.
5. Inyección de las muestras diluidas en los capilares.
6. Migración a voltaje constante con temperatura controlada por efecto Peltier, durante unos 8 minutos.
7. Lectura a 415 nm y aparición simultánea del perfil de las hemoglobinas en la pantalla del ordenador.

*NOTA : Estas etapas se realizan consecutivamente para el primer cargador introducido : los perfiles correspondientes a los tubos analizados se obtienen al cabo de unos 20 minutos. Para el cargador siguiente, las etapas 1, 2 y 3 (lectura de los códigos de barras, agitación y hemólisis de las sangres) se realizan durante la etapa 6 (migración) del cargador anterior.*

## II. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al final del análisis se realiza automáticamente la cuantificación relativa de las fracciones y los perfiles pueden ser interpretados. Los picos de hemoglobina A (Hb A), F (Hb F) y A2 (Hb A2) son identificados de forma automática y el pico de Hb A es situado en el centro de la ventana de edición de las curvas. Los perfiles electroforéticos obtenidos deben ser analizados visualmente para detectar las anomalías.
Las posiciones potenciales de las diferentes variantes de la hemoglobina (identificadas por las zonas Z1 a Z15) se muestran en la ventana de edición y aparecen en el informe de resultados. La tabla del párrafo «Interpretación» presenta las variantes conocidas que pueden estar presentes en cada zona.

Cuando el programa detecta una fracción de la hemoglobina en una zona dada, el título de esa zona es enmarcado.
Los perfiles son centrados automáticamente respecto a los picos de Hb A y de Hb A2 para facilitar su interpretación :

- en caso de ausencia de detección de los picos de Hb A y/o Hb A2 en un perfil, aparece un símbolo amarillo de alerta, y el centrado del perfil se realiza entonces respecto a la posición del pico de Hb A de los dos últimos perfiles obtenidos anteriormente en el mismo capilar, y ningún pico es identificado (excepto en caso de detección de Hb C, en el que los picos de Hb A2 y Hb C son identificados);
- en caso de presencia de Hb F en un perfil, sin detección de Hb A, el símbolo amarillo de alerta no aparece, y el centrado del perfil se realiza entonces respecto a la posición del pico de Hb F y los picos de Hb F y/o Hb A y/o Hb A2 son identificados;
- en caso de imposibilidad de centrado del perfil, aparece un símbolo rojo de alerta y los picos de Hb F y Hb A2 no son identificados (en este caso, contacte con el Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA);
- en caso de densidad óptica insuficiente en un perfil electroforético del control de migración (obtenido con el Control Hb A2 Normal identificado con su etiqueta con código de barras y analizado en un cargador n° 0), aparece un mensaje de advertencia que permite usar o descartar este análisis para la determinación de la posición del pico de Hb A. Después aparece un símbolo violeta de alerta en la ventana de edición y los picos de Hb A y de Hb A2 no son identificados.

En todos estos casos, las diferentes zonas de migración (Z1 a Z15) no aparecen ni en la ventana de edición ni en el informe de resultados.
En el perfil electroforético, las curvas de las fracciones de las hemoglobinas A2 y C son calculadas y redibujadas (o ajustadas) y se superponen a la curva nativa. Esta representación permite cuantificar la fracción Hb A2 en presencia de Hb C.

***ATENCIÓN : En algunos casos de hemoglobina C (homocigoto) o debido a un problema técnico, las fracciones Hb A2 y Hb C no son ajustadas, lo que implica una infravaloración de estas fracciones. En este caso, se recomienda cuantificar la fracción Hb A2 con otra técnica.***

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING.

## III. FIN DE LA SECUENCIA DE ANÁLISIS

El usuario debe realizar el procedimiento de extinción al final de la sesión de trabajo para conservar los capilares en condiciones óptimas.

## IV. LLENADO DE LOS CONTENEDORES DE REACTIVO

El aparato automático CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING permite una gestión automática de los reactivos.

**IMPORTANTE :** Es necesario seguir el procedimiento previsto para el cambio de los contenedores de reactivo (si no se hace correctamente los contenedores pueden despresurizarse y los análisis pueden verse afectados) y respetar el código de colores contenedor - conector en cada cambio de contenedor.

La aparición de la ventana de gestión de los reactivos indica que es necesario cambiar uno o varios reactivos :

- colocar un nuevo contenedor de tampón de análisis y / o,
- colocar un nuevo contenedor de solución hemolisante y / o,
- llenar el contenedor de lavado con la solución de lavado reconstituida y / o,
- llenar el contenedor de limpieza con agua destilada o desionizada filtrada y / o,
- vaciar el contenedor de desechos.

***ATENCIÓN : No use agua destilada comercial, como por ejemplo el agua para planchar (riesgo de deterioro importante de los capilares). Use exclusivamente agua de calidad ultra pura, como el agua para inyección.***

**IMPORTANTE :** Se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el contenedor de limpieza antes de llenarlo.

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING.

## CONTROL DE CALIDAD

Después de cada cambio de lote del tampón de análisis o de modo de trabajo, o después de un ciclo de limpieza de los capilares con CAPICLEAN, **y antes de iniciar una nueva serie de análisis**, es necesario realizar dos series de análisis con el Control Hb A2 Normal, SEBIA, referencia n° 4778, usando el cargador n° 0 específico previsto a este efecto (ver el capítulo REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS).
También se recomienda incluir una sangre control en cada serie de análisis (por ejemplo, una muestra de control que contenga las hemoglobinas A, F, S y C, como el Control Hb AFSC, SEBIA, referencia n° 4792, o una sangre normal, el Control Hb A2 Normal, SEBIA, referencia n° 4778, o el Control Hb A2 Patológico, SEBIA, referencia n° 4779).

**IMPORTANTE :** Para un uso óptimo de las sangres control en el CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING, es indispensable usar los tubos cónicos específicos previstos a este efecto, sus tapones correspondientes y los adaptadores para los tubos de control (ver «EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS»), e identificar cada uno de esos tubos con una etiqueta con el código de barras de la sangre control analizada (ver el párrafo Control Hb A2 Normal para el uso de un adaptador para los tubos de controles).

## RESULTADOS

### Valores

La detección directa en el capilar a 415 nm permite definir las concentraciones relativas (porcentajes) de cada fracción.
Los valores normales de cada fracción de hemoglobina han sido establecidos a partir de una población de 113 adultos (hombres y mujeres) en buen estado de salud, que presentan valores normales en HPLC :

Hemoglobina A : comprendida entre 96,7 y 97,8 %
Hemoglobina F : ≤ 0,5 % (*)
Hemoglobina A2 : comprendida entre 2,2 y 3,2 %

*(*) Ver interferencias y limitaciones*

*Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores normales.*

*NOTA : Los valores normales han sido obtenidos con los parámetros de integración por defecto del programa (alisado 0 e integración automática de las fracciones de la hemoglobina con la técnica HEMOGLOBIN(E)).*

***ATENCIÓN : Los valores normales (valores de referencia) sólo deben ser tenidos en cuenta en ausencia de variantes de la hemoglobina.***

### Interpretación

*Ver PERFILES ELECTROFORÉTICOS, figuras 1 - 18.*

Las diferentes zonas de migración de las variantes (identificadas como Z1 a Z15) aparecen en la ventana de edición de las curvas y en el informe de resultados. Al pasar el cursor de ratón sobre el nombre de una zona aparece una burbuja informativa que indica las variantes posibles de la hemoglobina que migran en esa zona.
Para cada fracción, la posición del máximo define la zona de migración.
Ver la tabla que muestra las variantes potenciales presentes en cada zona.

***ATENCIÓN : La graduación del eje de abscisas no puede en ningún caso usarse para la identificación de una variante de la hemoglobina.***

*1. Anomalías cualitativas : Hemoglobinopatías*

La mayoría son anomalías estructurales, debidas a una sustitución por mutación de un aminoácido por otro en una de las cadenas. Las consecuencias de la mutación varían en función de la posición del aminoácido mutado y del que le remplaza, siendo particularmente necesaria la integridad de algunas partes de la molécula para que sea viable y funcione correctamente.
Se han definido y descrito más de 900 variantes de la hemoglobina adulta. Las primeras hemoglobinas anormales estudiadas, y las más numerosas, son debidas a una modificación de la carga eléctrica global de la molécula, lo que permite detectarlas claramente por electroforesis.
Cinco hemoglobinas anormales principales presentan un interés particular desde un punto de vista antropológico y médico : S, C, E, O-Arab y D.
El kit CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) está destinado a la detección de las hemoglobinopatías y las talasemias.

### Hemoglobina S

Es la variante más frecuente, y es debida a una sustitución por mutación de un ácido glutámico de la cadena ß (aminoácido ácido nº 6) por una valina (aminoácido neutro): presenta pues un punto isoeléctrico aumentado respecto a la hemoglobina A. Su carga negativa global está por tanto disminuida en el pH de análisis : esta hemoglobina migra más rápidamente que la hemoglobina A. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), en tampón alcalino, la hemoglobina S migra entre las fracciones A y A2, a más o menos 1/3 de la distancia A - A2, desde la A2.

### Hemoglobina C

La mutación es debida a la sustitución de un ácido glutámico de la cadena ß por una lisina (aminoácido alcalino nº 6): presenta pues un punto isoeléctrico aumentado respecto a la hemoglobina A. Su carga negativa global está por tanto disminuida en el pH de análisis : esta hemoglobina migra más rápidamente que las hemoglobinas A y A2, de la que está parcialmente separada, lo que mejora netamente el diagnóstico médico. Además, las hemoglobinas C, E, O-Arab no se superponen en el perfil electroforético y pueden por tanto ser distinguidas fácilmente.

### Hemoglobina E

Un ácido glutámico de la cadena ß (nº 26) está sustituido por una lisina. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), la hemoglobina E migra justo después de la hemoglobina A2, de la que está totalmente separada. En presencia de hemoglobina E, la fracción A2 puede por tanto ser cuantificada para detectar una ß talasemia.

### Hemoglobina O-Arab

Un ácido glutámico de la cadena ß (nº 121) está sustituido por una lisina. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), la hemoglobina O-Arab migra con la fracción A2. En este caso, la cuantificación de la hemoglobina A2 es imposible. Cuando esta fracción es superior al 9 %, puede sospecharse la presencia de la hemoglobina O-Arab. Esta última no puede ser confundida con las hemoglobinas C y E, ya que éstas están separadas de la fracción A2.

### Hemoglobina D (-Los Angeles)

Un ácido glutámico de la cadena ß (nº 121) está sustituido por una glutamina. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), la hemoglobina D (denominada D-Punjab, D-Los Angeles, D-Chicago ó D-Portugal) migra en posición anódica respecto a la hemoglobina S, lo que permite distinguirla de ésta.

### 2. Anomalías cuantitativas : Talasemias

Constituyen un grupo bastante heterogéneo de afecciones genéticas caracterizadas por la reducción de la tasa de síntesis de una o varias cadenas de la hemoglobina. El mecanismo de esta reducción a escala molecular todavía no es bien conocido.
Existen diferentes síndromes talasémicos :

### Alfa talasemias

Se caracterizan por la disminución de la síntesis de las cadenas α, afectando por consiguiente a la síntesis de las 3 hemoglobinas fisiológicas. El exceso de síntesis de las cadenas ß y γ respecto a las cadenas α provoca la formación de tetrámeros sin cadena α:

- Hemoglobina Bart = γ4,
- Hemoglobina H = ß4.

La hemoglobina H posee un punto isoeléctrico relativamente bajo. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), migra en una posición mucho más anódica que la hemoglobina A (y puede estar presente en forma de una o varias fracciones).

### Beta talasemias

Se caracterizan por la disminución de la síntesis de las cadenas ß. Sólo se ve afectada la síntesis de la hemoglobina A.
Los porcentajes de las hemoglobinas F y A2 están por tanto aumentados respecto a la hemoglobina A. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), los valores de las diferentes hemoglobinas normales obtenidos permiten detectar los casos de beta talasemias.

*3. Notas*

- En caso de ausencia de la hemoglobina A, se puede observar una fracción débil en la zona de migración de esta última. Se trata de una hemoglobina F acetilada que representa de un 15 a un 25 % de la hemoglobina F. El sistema CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING está programado para evitar confundir esta fracción acetilada con la hemoglobina A.
- Puede sospecharse la presencia de una variante de la hemoglobina A2 si una fracción que presenta un porcentaje débil (de 0,5 a 3 %) es observada en una zona de migración comprendida entre la hemoglobina F y la hemoglobina δA'2 (variante de la A2), incluso dentro de las zonas habituales de migración de las hemoglobinas.
- En caso de presencia de una variante de la hemoglobina A2 (δA'2 o cualquier otra variante de la A2), se recomienda sumar el porcentaje de esta variante al de la hemoglobina A2 para un mejor diagnóstico de las beta talasemias.
- Algunas variantes de la hemoglobina (Hb Camperdown y Hb Okayama, por ejemplo) migran muy cerca de la Hb A y pueden ser confundidas con esta última.
- Algunas variantes de la hemoglobina (Hb Porto-Alegre y Hb S degradada) migran muy cerca de la Hb F y pueden ser confundidas con esta última.
- Las fracciones débiles que migran en la zona Z12 son a veces mal integradas (Hb Bart demasiado asimétricas, por ejemplo). Es necesario entonces suprimir la integración automática e integrarlas manualmente.
- Pueden observarse algunas fracciones débiles en las zonas de migración Z14 y Z15. Es indispensable confrontar estos resultados con el análisis hematológico del paciente y realizar análisis complementarios para determinar la naturaleza de estas fracciones (artefactos o anomalías de la hemoglobina).
- Al analizar sangres de recién nacidos, las muestras que contengan Hb F en concentración elevada pueden presentar una fracción Hb A alterada, especialmente a causa de la migración de Hb F degradada en esa zona. El porcentaje de Hb A indicado por el programa puede estar entonces sobreestimado. Además, en caso de presencia de variantes de la hemoglobina (> 4 %; S, C, E ó D-Punjab por ejemplo) en una sangre que contenga una concentración elevada de Hb F (> 60 %), es necesario realizar análisis complementarios para confirmar la presencia de Hb A.
- En los recién nacidos hasta la edad de 6 - 9 meses, se recomienda analizar varias muestras (por ejemplo, obtenidas mensualmente) para controlar la concentración de Hb F. Esto permitirá comprobar la disminución de Hb F y la eventual presencia de una variante. En caso de duda, se aconseja confirmar el resultado con una técnica complementaria y realizar un análisis a los padres.
- <u>Casos en los que la hemoglobina F (Hb F) puede estar aumentada (excepto en los recién nacidos)</u> :
  - en caso de embarazo;
  - pacientes con drepanocitosis con más de 2 años de edad, tratados con Hydrea® (hidroxicarbamida) y / o transfusionados y / o que presenten naturalmente una cantidad incrementada de Hb F debido a un fenómeno de compensación;
  - pacientes con más de 2 años de edad con el desorden PHHF (persistencia hereditaria de Hb F: hay entre un 20 y un 40 % de Hb F en los heterocigotos);
  - pacientes con más de 2 años de edad que presenten leucemia (de cualquier tipo), anemia hemolítica hereditaria, diabetes, enfermedad tiroidea, hiperactividad de la médula ósea, mieloma múltiple, o un cáncer en fase de metástasis.

  Si desea obtener más información, visite la página web : http://www.answers.com/topic/fetal-hemoglobin-test
- Al analizar sangres de pacientes con drepanocitosis (anemia falciforme) que hayan recibido transfusiones, y que presenten un porcentaje bajo de Hb A (< 10 %), la fracción Hb S puede aparecer desplazada de la zona Z5 hacia la zona Z6. Es indispensable confrontar este resultado con el análisis hematológico y realizar análisis complementarios para confirmar la presencia de Hb S.
- Al analizar sangres de pacientes con drepanocitosis antes de una transfusión, puede observarse una variación del porcentaje de la fracción Hb S en los análisis de un mismo paciente debido a la falta de homogeneidad de este tipo de muestra. Se recomienda homogenizar bien este tipo de muestra de sangre antes de analizarla.

### Interferencias y limitaciones

- Ver MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS.
- Analice únicamente muestras contenidas en los tubos de extracción recomendados en el párrafo « EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS » o en cualquier tubo de dimensiones equivalentes homologado para realizar análisis clínicos. Contacte con el Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA para obtener información relativa a estos dispositivos.
- No use directamente muestras cuyo volumen sea inferior a 1 mL.
- No use muestras de sangre antiguas o mal conservadas, ya que la presencia de hemoglobinas degradadas puede observarse en el perfil electroforético en forma de artefactos más o menos numerosos después de 7 días de conservación.
- Si las muestras se han conservado más de 10 días, se observa la presencia de aglomerados viscosos en los glóbulos rojos : es indispensable eliminarlos antes de realizar el análisis.
- Al analizar una muestra de sangre cuyo cociente [glóbulos rojos] / [plasma] está disminuido (caso de un paciente anémico), puede sospecharse la presencia de una variante Hb Constant Spring cuando se observa una fracción en las zonas de migración Z2 ó Z3. Esta fracción puede ser debida a la presencia de proteínas plasmáticas en la muestra (ver el párrafo Preparación de las muestras, Casos especiales).
- Cuando se detecte la presencia de una hemoglobina anormal, se recomienda usar otras técnicas de identificación (por ejemplo, electroforesis de las cadenas de globina) o consultar a un laboratorio especializado para un tipado preciso de la variante.

  **IMPORTANTE:** Es indispensable realizar el análisis hematológico como resultado complementario.
- La migración de una variante de la hemoglobina con una movilidad muy cercana a la fracción Hb A implica una subestimación de la fracción Hb A y de la variante, por lo que se produce una sobrestimación de la fracción Hb A2. Para obtener una cuantificación correcta de la fracción Hb A2, es necesario eliminar la integración de los picos de la variante y de la Hb A, para integrar conjuntamente esos 2 picos a continuación.

- Las muestras de algunos pacientes con una hemoglobina S homocigota y tratados con Hydrea® (hidroxicarbamida) pueden presentar una hemoglobina F cuya síntesis ha sido inducida por el tratamiento. En la técnica CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), no se han observado diferencias netas de movilidad entre esta hemoglobina F inducida y la hemoglobina F nativa.
- Teniendo en cuenta los principios analíticos de las técnicas actuales (principios de la electroforesis de zona, resolución), no hay garantías en cuanto a la detección total de todas las variantes de la hemoglobina.

### Asistencia técnica

Contacte con el Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA en caso de que el análisis sea defectuoso.
Puede solicitar al Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA las fichas de datos de seguridad de los diferentes reactivos del kit, así como la información relativa a la eliminación de los desechos.

## PERFORMANCE DATA

*NOTE : New CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) performance data have not yet been translated into each language of the instructions for use.*
*They are only available in French and English.*
*Each translation will be added in the instructions in the next version of the INSTRUCTIONS & SAFETY DATA SHEETS DVD.*

### Precision

The precision of the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with the CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument was evaluated in a study based on the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - USA) EP5-A2 guideline "Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurements Methods".
The means, standard deviations and coefficients of variation (CV’s %) (n = 80) were calculated for percentages (%) of hemoglobin fractions for each sample, using statistical tools recommended by CLSI.
The results obtained with the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure indicate a very good reproducibility for quantitative analysis for each hemoglobin component. All electrophoregrams were also interpreted visually.
The results presented below have been obtained using the standard parameters of the CAPILLARYS software (smoothing 0 and hemoglobin fractions automatic quantification with HEMOGLOBIN(E) analysis program).

*Reproducibility between capillaries from the same instrument*

Seven (7) different blood samples were run using the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure in all capillaries of the same CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument and with 1 lot of CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) kit. The analyzed blood samples included 2 samples with normal Hb A2 level (No. 1 and 5), 2 samples with increased Hb A2 level (No. 2 and 6), 1 sample with low Hb A2 level (No. 3), 1 pathological sample with Hb F and Hb S (No. 4) and 1 sample with increased Hb F level (No. 7). In this study, each blood sample was analyzed on all capillaries from the same instrument, including 40 runs over 20 working days (at 2 different times of the day). Within each run, samples were analyzed in duplicate.
The results for Hb A, Hb A2, Hb F and Hb S percentages are summarized in the following tables.

| | Sample No. 1 | Sample No. 2 | Sample No. 3 | Sample No. 4 | Sample No. 5 | Sample No. 6 | Sample No. 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mean Hb A % | 97.2 | 95.4 | 98.1 | 54.9 | 97.4 | 93.8 | 34.3 |
| Within-run reproducibility (CV %) | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 0.5 |
| Between-run reproducibility (CV %) | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 0.0 | 0.6 |
| Between-day reproducibility (CV %) | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.9 |
| Total (CV %) | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.4 | 0.1 | 0.1 | 1.2 |

| | Sample No. 1 | Sample No. 2 | Sample No. 3 | Sample No. 4 | Sample No. 5 | Sample No. 6 | Sample No. 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mean Hb A2 % | 2.8 | 4.7 | 1.9 | 2.8 | 2.6 | 6.2 | / |
| Within-run reproducibility (CV %) | 1.6 | 1.0 | 1.5 | 1.6 | 2.6 | 1.3 | / |
| Between-run reproducibility (CV %) | 0.4 | 0.0 | 1.2 | 0.4 | 0.0 | 0.6 | / |
| Between-day reproducibility (CV %) | 0.1 | 0.7 | 0.0 | 0.6 | 0.7 | 0.6 | / |
| Total (CV %) | 1.6 | 1.2 | 1.9 | 1.7 | 2.6 | 1.6 | / |

| | Sample No. 1 | Sample No. 2 | Sample No. 3 | Sample No. 4 | Sample No. 5 | Sample No. 6 | Sample No. 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mean Hb F % | / | / | / | 8.3 | / | / | 65.2 |
| Within-run reproducibility (CV %) | / | / | / | 0.7 | / | / | 0.3 |
| Between-run reproducibility (CV %) | / | / | / | 0.8 | / | / | 0.4 |
| Between-day reproducibility (CV %) | / | / | / | 0.3 | / | / | 0.5 |
| Total (CV %) | / | / | / | 1.1 | / | / | 0.7 |

| | Sample No. 1 | Sample No. 2 | Sample No. 3 | Sample No. 4 | Sample No. 5 | Sample No. 6 | Sample No. 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mean Hb S % | / | / | / | 33.9 | / | / | / |
| Within-run reproducibility (CV %) | / | / | / | 0.4 | / | / | / |
| Between-run reproducibility (CV %) | / | / | / | 0.4 | / | / | / |
| Between-day reproducibility (CV %) | / | / | / | 0.1 | / | / | / |
| Total (CV %) | / | / | / | 0.6 | / | / | / |

*In addition, none of the repeats showed false positive or false negative values.*

*Reproducibility between lots and instruments*

The reproducibility study was conducted using 7 different blood samples that were tested on 3 CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instruments with 3 lots of CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) kits. The analyzed blood samples included 2 samples with normal Hb A2 level (No. 1 and 5), 2 samples with increased Hb A2 level (No. 2 and 6), 1 sample with low Hb A2 level (No. 3), 1 pathological sample with Hb F and Hb S (No. 4) and 1 sample with increased Hb F level (No. 7). In this study, each blood sample was analyzed on all capillaries from the 3 CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instruments, including 60 runs over 27 working days (at 2 different times of the day). Within each run, samples were analyzed in duplicate.

The following table summarizes the total instrument-reagent C.V. % range for the individual hemoglobin Hb A, Hb A2, Hb F and Hb S fractions tested.

| Hemoglobin | Total CV % range |
|---|---|
| Hb A | 0.0 – 2.0 |
| Hb A2 | 0.0 – 5.5 |
| Hb F | 0.2 – 1.3 |
| Hb S | 0.4 – 0.7 |

## Linearity

The linearity of the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with the CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument was evaluated in a study based on the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - USA) EP6-A guideline “Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A statistical Approach”.

The results for percentages (%) of hemoglobin fractions were analyzed using statistical tools recommended by CLSI.

*Hb A2 linearity*

One Hb A2 enriched blood sample (containing 13.2 g/dL total hemoglobin with 9.9 % Hb A2) was mixed with a Hb A2 depleted blood sample (containing 13.4 g/dL total hemoglobin with 0.0 % Hb A2) within different proportions and the dilutions were electrophoresed with CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument.

The CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument gave a good linearity for Hb A and Hb A2 within the entire range studied, with a maximum of about 1.3 g/dL for Hb A2 (**between 0.0 and 9.9 % of Hb A2**).

*Hb F linearity*

One umbilical cord blood sample (containing 12.7 g/dL total hemoglobin with 75.5 % Hb F) was mixed with a normal blood sample (containing 8.8 g/dL total hemoglobin with 0.0 % Hb F) within different proportions and the dilutions were electrophoresed with CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument.

The CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument gave a good linearity for Hb A and Hb F within the entire range studied, with a maximum of about 9.6 g/dL for Hb F (**between 0.0 and 75.5 % of Hb F**).

*Hb S linearity*

One blood sample with Hb S (containing 6.0 g/dL total hemoglobin with 90.7 % Hb S and 0.0 % Hb A) was mixed with a normal blood sample (containing 9.1 g/dL total hemoglobin with 0.0 % Hb S and 97.5 % Hb A) within different proportions and the dilutions were electrophoresed with CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument.

The CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument gave a good linearity for Hb S within the entire range studied, with a maximum of about 5.4 g/dL for Hb S (**between 0.0 and 90.7 % of Hb S**) and a good linearity for Hb A within the entire range studied, with a maximum of about 8.9 g/dL for Hb A (**between 0.0 and 97.5 % of Hb A**).

*Hb C linearity*

One blood sample with Hb C (containing 11.5 g/dL total hemoglobin with 33.2 % Hb C) was mixed with a normal blood sample (containing 13.8 g/dL total hemoglobin with 0.0 % Hb C) within different proportions and the dilutions were electrophoresed with CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument.

The CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument gave a good linearity for Hb C within the entire range studied, with a maximum of about 3.8 g/dL for Hb C in the analyzed sample (**between 0.0 and 33.2 % of Hb C**).

*Hb D linearity*

One blood sample with Hb D (containing 14.3 g/dL total hemoglobin with 40.9 % Hb D) was mixed with a normal blood sample (containing 14.0 g/dL total hemoglobin with 0.0 % Hb D) within different proportions and the dilutions were electrophoresed with CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument.

The CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument gave a good linearity for Hb D within the entire range studied, with a maximum of about 5.8 g/dL for Hb D in the analyzed sample (**between 0.0 and 40.9 % of Hb D**).

*Hb E linearity*
One blood sample with Hb E (containing 10.8 g/dL total hemoglobin with 96.1 % Hb E) was mixed with a normal blood sample (containing 12.3 g/dL total hemoglobin with 0.0 % Hb E) within different proportions and the dilutions were electrophoresed with CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument.
The CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument gave a good linearity for Hb E within the entire range studied, with a maximum of about 10.4 g/dL for Hb E in the analyzed sample (**between 0.0 and 96.1 % of Hb E**).

## Accuracy – Internal correlation

The internal concordance study of the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with the CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument was evaluated in a study based on the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - USA) EP09-A2 guideline "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline – Second Edition (Interim Revision)".
The results for percentages (%) of hemoglobin fractions were analyzed using statistical tools recommended by CLSI.

*NOTE: The results presented below have been obtained from 1 internal accuracy study that has been performed in SEBIA facility. The analyzed blood samples and their diagnostic assessment were provided by 11 hospital laboratories in France and USA. The diagnosis was based on a routine HPLC procedure.*

The levels of hemoglobin fractions were measured in 56 blood samples, including 20 samples with hemoglobin variants such as hemoglobins S, C, D and E, both by electrophoretic separations obtained with the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure with the CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument and a commercially available HPLC system for hemoglobins analysis.
The measured values of hemoglobin fractions from both procedures were analyzed by a linear regression statistical procedure. The results of linear regression analysis for Hb A, Hb A2, Hb F and Hb S are tabulated below (y = CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) with CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument) :

| Hb fraction | Number of samples | Correlation coefficient | y-Intercept | Slope | Range of Hb % values CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) with CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument |
|---|---|---|---|---|---|
| Hb A | 56 | 0.996 | - 11.42 | 1.33 | 21.0 – 98.2 |
| Hb A2 | 44 | 0.978 | - 0.08 | 1.13 | 0.1 – 6.3 |
| Hb F | 56 | 1.000 | - 0.38 | 0.93 | 0.0 – 79.0 |
| Hb S | 8 | 0.998 | 0.06 | 1.07 | 6.8 – 41.2 |

All abnormal hemoglobins or abnormal levels of normal hemoglobins detected with the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with the CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument were in agreement with the comparative HPLC system. There was no case observed of false positive, i.e., detection of an abnormal band or abnormal level of a normal band where no such abnormality existed.

## Accuracy – External correlations

*NOTE: The results presented below have been obtained from 2 external accuracy studies that have been performed in 2 hospital laboratories located in the USA. The diagnosis was based on a routine HPLC procedure.*

In study No. 1, the levels of hemoglobin fractions were measured in 123 blood samples, including 33 samples with hemoglobin variants such as hemoglobins S, C and E, both by electrophoretic separations obtained with the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure with the CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument and a commercially available HPLC system for hemoglobins analysis.
The measured values of hemoglobin fractions from both procedures were analyzed by a linear regression statistical procedure. The results of linear regression analysis for Hb A, Hb A2, Hb F, Hb S and Hb C are tabulated below (y = CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) with CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument) :

| Hb fraction | Number of samples | Correlation coefficient | y-Intercept | Slope | Range of Hb % values CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) with CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument |
|---|---|---|---|---|---|
| Hb A | 121 | 0.999 | - 1.71 | 1.14 | 0.0 – 98.8 |
| Hb A2 | 93 | 0.986 | - 0.31 | 1.16 | 0.9 – 6.5 |
| Hb F | 103 | 0.997 | - 0.65 | 0.97 | 0.0 – 90.3 |
| Hb S | 26 | 0.998 | - 0.10 | 1.05 | 14.2 – 54.8 |
| Hb C | 5 | 0.999 | - 1.08 | 1.02 | 9.7 – 44.7 |

All abnormal hemoglobins or abnormal levels of normal hemoglobins detected with the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with the CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument were in agreement with the comparative HPLC system. There was no case observed of false positive, i.e., detection of an abnormal band or abnormal level of a normal band where no such abnormality existed.

In study No. 2, the levels of hemoglobin fractions were measured in 183 blood samples, including 83 samples with hemoglobin variants such as hemoglobins S, C and D, both by electrophoretic separations obtained with the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure with the CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument and a commercially available HPLC system for hemoglobins analysis.
The measured values of hemoglobin fractions from both procedures were analyzed by a linear regression statistical procedure. The results of linear regression analysis for Hb A, Hb A2, Hb F, Hb S, Hb C and Hb D are tabulated below (y = CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) with CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument) :

| Hb fraction | Number of samples | Correlation coefficient | y-Intercept | Slope | Range of Hb % values CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) with CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument |
|---|---|---|---|---|---|
| Hb A | 180 | 0.991 | - 1.75 | 1.13 | 0.0 – 98.2 |
| Hb A2 | 113 | 0.926 | - 0.18 | 1.04 | 0.4 – 6.0 |
| Hb F | 181 | 0.991 | 0.11 | 1.06 | 0.0 – 98.2 |
| Hb S | 67 | 0.996 | 0.66 | 1.00 | 5.0 – 93.9 |
| Hb C | 13 | 0.996 | 0.81 | 0.94 | 12.5 – 45.7 |
| Hb D | 3 | 0.980 | 3.04 | 1.01 | 34.7 – 40.9 |

All abnormal hemoglobins or abnormal levels of normal hemoglobins detected with the CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) procedure performed with the CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING instrument were in agreement with the comparative HPLC system. There was no case observed of false positive, i.e., detection of an abnormal band or abnormal level of a normal band where no such abnormality existed.

sebia

# CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)

Ref. 2007

**CAPILLARYS 2**

*Technique CAPILLARYS Sangs de cordons*
*CAPILLARYS Cord blood procedure*

IVD

CE

2012/06

# TÉCNICA CAPILLARYS SANGRE DE CORDÓN EN EL SISTEMA CAPILLARYS 2

## UTILIZACIÓN

La técnica CAPILLARYS SANGRE DE CORDÓN permite la separación en medio alcalino (pH 9,4) de las hemoglobinas normales de la sangre humana a partir de cordón umbilical de recién nacido (F y A) y la detección de las principales hemoglobinas anormales (especialmente S, C, E, D y Bart), mediante electroforesis capilar en el sistema automático CAPILLARYS 2.
El sistema CAPILLARYS 2 permite realizar todas las secuencias de la electroforesis hasta la obtención del perfil de las hemoglobinas para el análisis cualitativo o cuantitativo. El análisis puede realizarse usando el hemolisado de glóbulos rojos sedimentados, centrifugados o lavados; el lavado de los glóbulos rojos no es indispensable.
**Esta técnica debe realizarse con los reactivos del kit CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E).**

Las hemoglobinas, separadas en capilares de sílice fundido, son detectadas directamente en una burbuja existente en el capilar mediante espectrofotometría de absorbancia a 415 nm, que es la longitud de onda de absorción específica de las hemoglobinas.
Los perfiles electroforéticos son analizados automáticamente para detectar las anomalías, con identificación de los perfiles normales y patológicos.
La detección directa proporciona una cuantificación relativa precisa de cada fracción individual de las hemoglobinas. Además, la buena separación de las diferentes fracciones facilita el diagnóstico de la drepanocitosis, ya que permite diferenciar la fracción S de otras variantes de la hemoglobina.

Para uso en diagnóstico *In Vitro*.

## PRINCIPIO DEL TEST

La hemoglobina es una molécula compleja compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, idénticas dos a dos, estando cada cadena ligada al hemo, que es un núcleo tetrapirrólico (porfirina) ligado a un átomo de hierro. El hemo es común a todas las hemoglobinas. La parte proteica responsable del tipo de hemoglobina se denomina globina. Se conocen principalmente las cadenas polipeptídicas α, ß, δ y γ.
En humanos podemos encontrar las hemoglobinas normales siguientes :
- Hemoglobina A........................................... = $\alpha 2\ \beta 2$
- Hemoglobina A2......................................... = $\alpha 2\ \delta 2$
- Hemoglobina fetal F................................... = $\alpha 2\ \gamma 2$

La cadena α es común a estas tres hemoglobinas.

La estructura espacial de la hemoglobina (como la del resto de proteínas) depende de la naturaleza y la secuencia de los aminoácidos que forman las cadenas. Las uniones que se forman entre los diferentes aminoácidos son responsables de la forma de la molécula, de su estabilidad y de sus propiedades. Situadas en un campo eléctrico, las hemoglobinas se desplazan en función de su carga, del tamaño de la molécula, de la fuerza iónica, del pH del tampón y de la naturaleza del soporte. Las variantes de la hemoglobina son debidas a mutaciones de algunos aminoácidos que implican cargas de superficie diferentes en la hemoglobina y, por consiguiente, movilidades diferentes en la electroforesis.
Las anomalías de la hemoglobina son de dos tipos :
- anomalías cualitativas o estructurales, que se denominan hemoglobinopatías;
- anomalías cuantitativas o de regulación, que se denominan talasemias.

La electroforesis de las hemoglobinas de la sangre humana es un análisis muy útil en el laboratorio de análisis clínicos para investigar las anomalías cualitativas y cuantitativas de la hemoglobina. Paralelamente a las técnicas de electroforesis en diferentes soportes, entre los que está el gel de agarosa, se ha desarrollado la técnica de electroforesis capilar, que ofrece las ventajas de una automatización completa del análisis, separaciones rápidas y una resolución excelente. Se define como una técnica de separación electrocinética realizada en un tubo de diámetro interno inferior a 100 µm lleno de un tampón compuesto por electrolitos. Se considera una tecnología intermedia entre la electroforesis de zona en soporte y la cromatografía líquida.
El sistema CAPILLARYS 2 usa el principio de la electroforesis capilar en solución libre, que representa la forma más corriente de electroforesis capilar. Permite la separación de moléculas cargadas en función de su movilidad electroforética propia en un tampón de pH dado y, según el pH del electrolito, de un flujo electroendosmótico más o menos importante. El sistema CAPILLARYS 2 posee una serie de capilares en paralelo, permitiendo realizar 7 análisis simultáneos. En este sistema, la inyección en los capilares de las muestras diluidas con la solución hemolisante se realiza en el ánodo por aspiración. La separación se realiza a continuación aplicando una diferencia de potencial de varios miles de voltios en los extremos de cada capilar. La detección directa de las hemoglobinas se efectúa a 415 nm en el lado catódico. Los capilares se lavan antes de cada análisis con una solución de lavado, y luego con el tampón de análisis.
Con el tampón de pH alcalino usado, el orden de migración de las principales hemoglobinas normales y anormales es el siguiente, del cátodo al ánodo : C, A2/O-Arab, F-Ouled Rabah, E, S, D, G-Filadelfia, Korle-Bu, F, F degradada, A, A degradada y Bart. Las variantes debidas a la mutación de la cadena gamma pueden aparecer en algunas zonas del perfil.
Hay que tener en cuenta que la anhidrasa carbónica no se detecta en el perfil electroforético de las hemoglobinas en la electroforesis capilar.

## REACTIVOS SUMINISTRADOS EN EL KIT CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)

*Ver la parte anterior «TÉCNICA CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) EN EL SISTEMA CAPILLARYS 2».*

## REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

***ATENCIÓN : Ver las fichas de datos de seguridad.***

### 1. CONTROL Hb AF

**Composición**
El Control Hb AF (SEBIA, referencia n° 4777) se obtiene a partir de una mezcla de sangres humanas normales de adultos y de sangres de cordón de recién nacidos. Un procedimiento de estabilización permite conservar el Control Hb AF en forma liofilizada.

### Aplicación

El Control Hb AF está destinado, **antes de realizar una nueva serie de análisis**, al control de la migración así como al control de calidad del método de detección de la hemoglobina humana F mediante electroforesis con la técnica CAPILLARYS SANGRE DE CORDÓN.
Reconstituya, con precisión, el vial liofilizado del Control Hb AF con el volumen de agua destilada o desionizada indicado en las instrucciones del Control Hb AF. Déjelo en reposo 30 minutos y después agítelo suavemente (evite la formación de espuma).

**Control de migración** : El Control Hb AF debe ser usado de la forma siguiente :

- Dispense el Control Hb AF reconstituido en un microtubo.
- Corte el tapón del microtubo.
- Ponga el microtubo, colocado en un tubo de hemólisis nuevo que servirá de soporte (identificado con la etiqueta con el código de barras específico del Control Hb AF) en la posición 1 del cargador específico n° 0 del CAPILLARYS 2 previsto a este efecto, equipado con un segmento de dilución nuevo.
- Dispense 4 mL de solución hemolisante CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) en un tubo de hemólisis sin que se formen burbujas de aire y coloque este tubo en la posición 8 del cargador n° 0.

  **IMPORTANTE :** Compruebe que no haya espuma en el tubo de solución hemolisante antes de colocarlo en el cargador.
- Inicie el análisis : Introduzca el cargador n° 0 en el sistema CAPILLARYS 2, seleccione « dilución automática » en la ventana que aparecerá en pantalla y valide.
- **Después de cada cambio del contenedor del tampón de análisis (incluso si el lote no cambia) o de modo de trabajo, después de un ciclo de limpieza de los capilares con CAPICLEAN o después de una activación de los capilares**, realice una segunda serie de análisis con este control, volviendo a introducir inmediatamente el cargador n° 0 con el mismo segmento de dilución, que contiene el Control Hb AF diluido en el primer análisis (saque el microtubo que contiene el Control Hb AF y deje el tubo de soporte identificado con la etiqueta con el código de barras).
- en la ventana que aparecerá en pantalla denominada « Control Hb AF », seleccione « dilución manual » y valide.

Los resultados obtenidos son entonces tenidos en cuenta automáticamente por el programa para el análisis de los resultados.

**IMPORTANTE :** Para un uso óptimo del Control Hb AF en el CAPILLARYS 2, es indispensable usar una etiqueta con código de barras, destinada a identificar el tubo de hemólisis que servirá de soporte al microtubo que contenga el Control Hb AF (corte el tapón del microtubo antes de usarlo).

*NOTA : Al usar por primera vez el programa de análisis «SANGRE DE CORDÓN» en el automático para electroforesis CAPILLARYS 2 ó después de un paro prolongado (más de una semana), se recomienda realizar 3 series de análisis sucesivos con el Control Hb AF.*

**Control de calidad** : El Control Hb AF debe ser usado como una sangre humana normal. Después de la reconstitución, use directamente el Control Hb AF como una muestra de sangre a analizar o como control de la migración (con el cargador n° 0, ver el párrafo anterior). Será tratado automáticamente con la solución hemolisante. Se recomienda incluir el Control Hb AF en cada serie de análisis.

**IMPORTANTE :** Para un uso óptimo del Control Hb AF en el CAPILLARYS 2, es indispensable usar una etiqueta con código de barras, destinada a identificar el tubo de hemólisis que servirá de soporte al microtubo que contenga el Control Hb AF (corte el tapón del microtubo antes de usarlo).

### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

*Ver las instrucciones del Control Hb AF.*

*NOTA : El segmento de dilución que contenga el Control Hb AF hemolisado puede congelarse entre - 18 °C y - 22 °C. No congele y descongele el segmento que contenga el control hemolisado más de 3 veces.*

Como ninguna prueba de análisis puede probar la ausencia de los virus VIH, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C o de cualquier otro agente infeccioso, el Control Hb AF debe ser manipulado con las precauciones habituales para evitar contaminarse.
Este control, analizado usando técnicas autorizadas por una autoridad competente (FDA, ANSM…), es negativo :

- para la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B,
- para la presencia de anticuerpos anti-VHC,
- para la presencia de anticuerpos anti-VIH 1 y anti-VIH 2.

## 2. AGUA DESTILADA O DESIONIZADA

### Uso

Para lavar los capilares del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS 2, SEBIA.
Se recomienda usar agua destilada o desionizada filtrada (con un filtro de porosidad ≤ 0,45 µm).
Renueve el agua cada día para evitar contaminaciones microbianas. En caso de conservación prolongada, añada 350 µL/L de CLEAN PROTECT (SEBIA, referencia n° 2059 : 1 vial de 5 mL).

**IMPORTANTE :** Antes de llenar el contenedor de agua, se recomienda lavarlo con agua destilada o desionizada en abundancia.

## 3. CAPICLEAN

### Presentación

El vial de solución enzimática concentrada CAPICLEAN (SEBIA, referencia n° 2058 : 1 vial de 25 mL) contiene : enzimas proteolíticos, surfactantes y componentes inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

***ATENCIÓN : Ver la ficha de datos de seguridad.***

### Uso

Para la limpieza de la cánula de muestras del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS 2, SEBIA, durante el ciclo de limpieza CAPICLEAN.

**IMPORTANTE :** Realice un ciclo de limpieza con CAPICLEAN al menos una vez por semana y, como máximo, una vez al día, o cada 500 análisis cuando se hayan realizado en menos de una semana.

*Ver las instrucciones del CAPICLEAN, SEBIA.*

**IMPORTANTE :** No reutilice el segmento de dilución tras la limpieza de la cánula.

### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

CAPICLEAN debe conservarse en nevera (entre 2 y 8 °C). Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. NO CONGELAR.
Pueden observarse un precipitado o partículas agregadas en suspensión (flóculos) en el vial del CAPICLEAN sin que su funcionamiento se vea afectado.
No resuspenda el precipitado o las partículas. Se recomienda pipetear sólo el sobrenadante.

## 4. SOLUCIÓN DE HIPOCLORITO DE SODIO (para la limpieza de la cánula de muestras)

### Preparación

Prepare una solución de hipoclorito de sodio (lejía) con un 2 a 3 % de cloro a partir de una dosis concentrada de 250 mL con 9,6 % de cloro diluida hasta 1 litro (volumen final) con agua destilada o desionizada fría.

### Uso

Para la limpieza de la cánula de muestras del aparato automático para electroforesis capilar, CAPILLARYS 2, SEBIA (mantenimiento semanal para eliminar cualquier proteína que se haya adsorbido a la cánula).

*Ver el manual de instrucciones del CAPILLARYS 2, SEBIA.*

- Use el cargador de muestras específico para el mantenimiento (n° 100).
- Coloque en este cargador, en la posición 1, un tubo de hemólisis que contenga 2 mL de la solución de hipoclorito de sodio preparada anteriormente.
- Introduzca el cargador n° 100 de mantenimiento en el sistema CAPILLARYS 2.
- En el menú de la ventana "MANTENIMIENTO" que aparecerá en pantalla, seleccione la opción "Iniciar la limpieza de la cánula (solución de hipoclorito de sodio)", y luego valide.

### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

La solución de hipoclorito de sodio diluida puede conservarse 3 meses a temperatura ambiente en un recipiente de plástico cerrado herméticamente, protegido de la luz solar y de cualquier fuente de calor o ignición, y alejado de ácidos y amoniaco.

## 5. SOLUCIÓN DE LAVADO CAPILLARYS / MINICAP

### Preparación

El vial de la solución de lavado concentrada (SEBIA, referencia n° 2052 : 2 viales de 75 mL) debe completarse hasta 750 mL con agua destilada o desionizada.
Después de la dilución, la solución de lavado contiene una solución alcalina pH ≈ 12.

### Uso

Para el lavado de los capilares del CAPILLARYS 2. Reactivo adicional necesario en caso de realizar series inferiores a 40 análisis.

**IMPORTANTE :** Antes de llenar el vial de solución de lavado, se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el cuello del contenedor, el tapón-conector y el tubo para evitar la acumulación de sales.

### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

Las soluciones de lavado concentrada y diluida deben conservarse a temperatura ambiente o en nevera en contenedores cerrados para evitar la evaporación.
La solución concentrada es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial.
La solución diluida es estable durante 3 meses.
Deseche la solución de lavado diluida si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana.

## 6. SALINA

### Preparación

Solución de NaCl 0,15 M (9 g/L) en agua destilada o desionizada.

### Uso

Para lavar los glóbulos rojos antes de conservarlos a - 80 °C, si es necesario.

### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

La solución salina puede conservarse a temperatura ambiente o en nevera.
Deseche la solución al cabo de 3 meses o si cambia de aspecto o aparece turbidez debido a contaminación microbiana. Para una conservación prolongada, añada 1 g/L de azida sódica.

## REACTIVO OPCIONAL (NO SUMINISTRADO)

***ATENCIÓN : Ver las fichas de datos de seguridad.***

## CONTROL Hb AFSC

### Composición

El Control Hb AFSC (SEBIA, referencia n° 4792) se obtiene a partir de una mezcla de sangres humanas, enriquecida con hemoglobina F y con las variantes S y C. Un procedimiento de estabilización permite conservar el Control Hb AFSC en forma liofilizada.

### Aplicación

El Control Hb AFSC está destinado al control de calidad de las separaciones electroforéticas de las hemoglobinas humanas realizadas con la técnica CAPILLARYS SANGRE DE CORDÓN. Debe ser usado como una sangre humana normal.
Se recomienda incluir el Control Hb AFSC en cada serie de análisis.
Reconstituya, con precisión, el vial liofilizado del Control Hb AFSC con el volumen de agua destilada o desionizada indicado en las instrucciones del Control Hb AFSC. Deje reposar 30 minutos y agite suavemente (evite la formación de espuma).

**Control de calidad con el cargador n° 0** :
El Control Hb AFSC debe ser usado de la forma siguiente :
- Dispense el Control Hb AFSC reconstituido en un microtubo.
- Corte el tapón del microtubo.
- Ponga el microtubo, colocado en un tubo de hemólisis nuevo que servirá de soporte, en la posición 1 del cargador específico n° 0 del CAPILLARYS 2, previsto a este efecto, equipado con un segmento de dilución nuevo.

**IMPORTANTE :** Para un uso óptimo del Control Hb AFSC, es indispensable usar una etiqueta con código de barras, destinada a identificar el tubo de hemólisis que servirá de soporte al microtubo que contenga el Control Hb AFSC (corte el tapón del microtubo antes de usarlo).

- Dispense 4 mL de solución hemolisante CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) en un tubo de hemólisis sin que se formen burbujas de aire; coloque este tubo en la posición 8 del cargador n° 0.

**IMPORTANTE :** Compruebe que no haya espuma en el tubo de solución hemolisante antes de colocarlo en el cargador.

- Inicie el análisis : Introduzca el cargador n° 0 en el sistema CAPILLARYS 2, seleccione « dilución automática » en la ventana que aparecerá en pantalla y valide.

Los resultados obtenidos son entonces tenidos en cuenta automáticamente por el programa para el análisis de los resultados.

**Control de calidad entre una serie de muestras** :
El Control Hb AFSC debe ser usado como una sangre humana normal. Después de la reconstitución, use directamente el Control Hb AFSC como una muestra de sangre a analizar o como control de migración (con el cargador n° 0, ver el párrafo anterior). Será tratado automáticamente con la solución hemolisante. Se recomienda incluir el Control Hb AFSC en cada serie de análisis.

**IMPORTANTE :** Para un uso óptimo del Control Hb AFSC en el CAPILLARYS 2, es indispensable usar una etiqueta con código de barras, destinada a identificar el tubo de hemólisis que servirá de soporte al microtubo que contenga el Control Hb AFSC (corte el tapón del microtubo antes de usarlo).

### Conservación, estabilidad y señales de deterioro

*Ver las instrucciones del Control Hb AFSC.*

Como ninguna prueba de análisis puede probar la ausencia de los virus VIH, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C o de cualquier otro agente infeccioso, el Control Hb AFSC debe ser manipulado con las precauciones habituales para evitar contaminarse.
Este control, analizado usando técnicas autorizadas por una autoridad competente (FDA, ANSM…), es negativo :
- para la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B,
- para la presencia de anticuerpos anti-VHC,
- para la presencia de anticuerpos anti-VIH 1 y anti-VIH 2.

*NOTAS :*
*Las pruebas realizadas durante la validación de los reactivos muestran que, para las diferentes soluciones y usando material adaptado al volumen a reconstituir, una variación del volumen final de un ± 5 % no tiene ningún efecto adverso en el análisis.*
*El agua destilada o desionizada, usada para la reconstitución de las soluciones, debe estar exenta de contaminación bacteriana o fúngica (use un filtro de 0,22 µm) y debe tener una resistividad superior a 10 Megohms x cm.*

## EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS

1. Sistema de electroforesis capilar CAPILLARYS 2 SEBIA, referencia n° 1222.
2. Cargadores, suministrados con el sistema CAPILLARYS 2.
3. Contenedores de plástico suministrados con el sistema CAPILLARYS 2 : contenedor para la limpieza de los capilares (debe llenarse con agua destilada o desionizada), contenedor de solución de lavado y contenedor de desechos.

## MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS

### Extracción y conservación de las muestras

El análisis se realiza con muestras frescas de sangre de cordón umbilical de recién nacidos, recogidas con anticoagulante que contenga EDTA. No use anticoagulantes que contengan yodoacetato. Las sangres deben ser obtenidas según los métodos establecidos de uso en el laboratorio clínico.

**IMPORTANTE :** El volumen de sangre recogido no debe superar el volumen recomendado para el tubo usado. En caso contrario, el volumen de anticoagulante será insuficiente para el volumen de sangre recogido, y podría observarse la presencia de aglomerados viscosos en los glóbulos rojos. Es indispensable eliminarlos antes de realizar el análisis.

Las muestras (sangres o glóbulos rojos sedimentados o centrifugados) pueden conservarse un máximo de siete días en nevera (entre 2 y 8 °C).
Para conservaciones prolongadas, congele rápidamente las muestras a - 80 °C (como máximo durante las 8 horas siguientes a su obtención) después de haber lavado los glóbulos rojos según el procedimiento siguiente : Centrifugue la sangre total, durante 5 minutos a 5.000 r.p.m.; deseche el plasma; lave 2 veces los glóbulos rojos con 10 volúmenes de salina (centrifugue después de cada lavado) y elimine el exceso de salina de de la superficie del coágulo globular lavado; agite en el vortex antes de congelarlo.
Las sangres congeladas a - 80 °C son estables un máximo de 3 meses.

**IMPORTANTE :** Para una conservación óptima de las muestras, no las conserve a - 20 °C sino a - 80 °C (ver la BIBLIOGRAFÍA : J Bardakdjian-Michau *et al*, 2003).

*NOTA : No conserve las sangres a temperatura ambiente.*

Las hemoglobinas (Hb) de las muestras conservadas en nevera (entre 2 y 8 °C) se degradan progresivamente.
En una muestra conservada más de 7 días en nevera :
- La fracción Hb F degradada se vuelve más visible y aparece formando una ondulación en la pendiente en la parte catódica del pico de la Hb A (zona C9, ver la tabla del párrafo « Interpretación »). Esto implica una sobreestimación del valor de la fracción Hb A.
- En presencia de Hb A, aparece una fracción débil plana correspondiente a la Hb A degradada en una posición anódica respecto a la Hb A (zona C11, ver la tabla del párrafo « Interpretación »),
- Como consecuencia de la degradación de la muestra, aparece una fracción débil, correspondiente a metahemoglobina, en la zona de migración de la Hb E (zona C3, ver la tabla del párrafo « Interpretación »).

Si la muestra se ha conservado más de 10 días en nevera, se observa la presencia de aglomerados viscosos en los glóbulos rojos : es indispensable eliminarlos antes de realizar el análisis.

### Preparación de las muestras

- Deje sedimentar los glóbulos rojos de la sangre total durante varias horas en nevera (2 - 8 °C) o centrifugue la sangre total durante 5 minutos a 5.000 r.p.m.
- Elimine con cuidado el máximo de plasma.
- **Agite en el vortex durante 5 segundos.**

**IMPORTANTE :** No use muestras que contengan una altura máxima de plasma residual superior a 3 mm; si hay más de 3 mm de plasma el análisis puede verse afectado.

### Muestras a descartar

- No use muestras de sangre total no sedimentadas.
- No use muestras de sangre antiguas o mal conservadas, ya que la hemólisis automática de las muestras puede ser perturbada por la presencia de aglomerados viscosos entre los glóbulos rojos; el perfil electroforético también puede ser afectado por productos de degradación de las hemoglobinas (o artefactos).

## PROCEDIMIENTO

El sistema CAPILLARYS 2 es un instrumento multiparamétrico automático que permite realizar el análisis de las hemoglobinas en 7 capilares en paralelo según las etapas siguientes :

- lectura de los códigos de barras de los tubos primarios (hasta 7) y del cargador;
- hemólisis y dilución de las muestras a partir de los tubos primarios (sin plasma);
- lavado de los capilares;
- inyección de las muestras hemolisadas;
- separación y detección directa de las hemoglobinas en los capilares.

Las etapas manuales son las siguientes :

- colocación de los tubos primarios (destapados) en los cargadores en las posiciones 1 a 7;
- colocación del tubo de la solución hemolisante en la posición 8 de los cargadores;
- colocación de un segmento de dilución nuevo en el cargador;
- introducción en el sistema CAPILLARYS 2;
- recuperación de los cargadores después del análisis.

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS 2.

### I. PREPARACIÓN DEL ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

1. Encienda el CAPILLARYS 2 y el ordenador de control.
2. Abra el programa de gestión PHORESIS y valide el nivel de los reactivos, tras lo cual el aparato se iniciará automáticamente.
3. Para la técnica CAPILLARYS SANGRE DE CORDÓN, use el kit CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) con el programa de análisis «SANGRE DE CORDÓN». Para seleccionar el programa de análisis «SANGRE DE CORDÓN» y conectar el contenedor de tampón CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) al aparato, lea detenidamente el manual de instrucciones del CAPILLARYS 2.
4. El cargador de muestras posee 8 posiciones para tubos. Coloque hasta 7 tubos primarios sin plasma en cada cargador (posiciones 1 a 7), destapando cada tubo y de forma que el código de barras de cada tubo quede encarado hacia la ventana de lectura del mismo.

   **IMPORTANTE :** Si el número de tubos que va a analizar es inferior a 7, complete el cargador poniendo tubos con agua destilada o desionizada.
5. Dispense 4 mL de solución hemolisante CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) en un tubo de hemólisis sin que se formen burbujas de aire, y coloque este tubo en la posición 8 del cargador de muestras.

   **IMPORTANTE :** Compruebe que no haya espuma en el tubo de solución hemolisante antes de colocarlo en el cargador.
6. Ponga un segmento de dilución nuevo en cada cargador. En caso de ausencia del segmento, el cargador será expulsado.
7. Introduzca el cargador n° 0 con el Control Hb AF : Ver el párrafo anterior « Control Hb AF » para su uso en la técnica CAPILLARYS SANGRE DE CORDÓN, en la parte « Control de migración ».
8. Introduzca el (o los) cargador(es) completo(s) en el sistema CAPILLARYS 2 por el orificio de entrada situado en medio del aparato. Se pueden introducir hasta trece cargadores a la vez (incluido el cargador n° 0 para la sangre de control), pudiéndose añadir nuevos cargadores de forma continua a medida que se vaya completando el análisis de los cargadores ya introducidos.
9. Saque de la cinta de salida, situada a la izquierda del aparato, los cargadores ya analizados.
10. Coja con precaución el segmento de dilución usado y deséchelo.

    ***ATENCIÓN : Manipule con cuidado los segmentos de dilución que contengan muestras biológicas.***

### DILUCIÓN - MIGRACIÓN - DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

1. Lectura de los códigos de barras de los tubos primarios de muestra y del cargador.
2. Dilución de las sangres con la solución hemolisante, con limpieza de la cánula de muestras entre cada dilución.
3. Lavado de los capilares.
4. Inyección de las muestras diluidas en los capilares.
5. Migración a voltaje constante con temperatura controlada por efecto Peltier, durante unos 8 minutos.
6. Lectura a 415 nm y aparición simultánea del perfil de las hemoglobinas en la pantalla del ordenador.

*NOTA : Estas etapas se realizan consecutivamente para el primer cargador introducido : los perfiles correspondientes a los tubos analizados se obtienen al cabo de unos 20 minutos. Para el cargador de muestras siguiente, las etapas 1 y 2 (lectura de los códigos de barras y hemólisis de las sangres) se realizan durante la etapa 5 del cargador anterior.*

## II. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Al final del análisis se realiza automáticamente la cuantificación relativa de las fracciones y los perfiles pueden ser interpretados. Los picos de hemoglobina A (Hb A), F (Hb F) y A2 (Hb A2) son identificados de forma automática y el pico de Hb F es situado en una posición determinada. Los perfiles electroforéticos obtenidos deben ser analizados visualmente para detectar las anomalías.
Las posiciones potenciales de las diferentes variantes de la hemoglobina (identificadas por las zonas C1 a C12) se muestran en la ventana de edición y aparecen en el informe de resultados. La tabla del párrafo « Interpretación » presenta las variantes conocidas que pueden estar presentes en cada zona. Cuando el programa detecta una fracción de la hemoglobina en una zona dada, el título de esa zona es enmarcado.
La identificación de las sangres normales y de las sangres patológicas se realiza automáticamente y los perfiles pueden ser distinguidos en el mosaico de curvas como normales en azul o patológicos en rojo. Esta identificación está basada en la detección de las fracciones anormales de la hemoglobina en un perfil dado o en la ausencia de detección de las fracciones Hb F ó Hb A.
El programa de gestión ha sido optimizado para limitar la interferencia de las formas degradadas de la hemoglobina en el análisis. Sin embargo, el programa permite por ejemplo distinguir valores muy bajos de hemoglobina Bart alertando así al usuario de un posible diagnóstico de alfa-talasemia.

Los perfiles son centrados automáticamente respecto al pico de Hb F para facilitar su interpretación :

- en caso de ausencia de detección del pico de Hb F en un perfil, aparece un símbolo amarillo de alerta, y el centrado del perfil se realiza entonces respecto a la posición del pico de Hb F de los dos últimos perfiles obtenidos anteriormente en el mismo capilar ;
- en caso de imposibilidad de centrado del perfil, aparece un símbolo rojo de alerta y los picos de Hb A, Hb F y Hb A2 no son identificados (Contacte con el Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA) ;
- en caso de densidad óptica insuficiente en un perfil electroforético del control de migración (obtenido con el Control Hb AF identificado con su etiqueta con código de barras y analizado en un cargador n° 0), aparece un mensaje de advertencia que permite usar o descartar este análisis para la determinación de la posición del pico de Hb F. Después aparece un símbolo violeta de alerta en la ventana de edición y los picos de Hb A, Hb A2 y Hb F no son identificados.

En todos estos casos, las diferentes zonas de migración (C1 a C12) no aparecen ni en la ventana de edición ni en el informe de resultados.

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS 2.

## III. FIN DE LA SECUENCIA DE ANÁLISIS

El usuario debe realizar el procedimiento de extinción al final de la sesión de trabajo para conservar los capilares en condiciones óptimas.

## IV. LLENADO DE LOS CONTENEDORES DE REACTIVO

El aparato automático CAPILLARYS 2 permite una gestión automática de los reactivos.

**IMPORTANTE :** Es necesario seguir el procedimiento previsto para el cambio de los contenedores (si no se hace correctamente los contenedores pueden despresurizarse y los análisis pueden verse afectados) y respetar el código de colores contenedor - conector en cada cambio de contenedor.

La aparición de la ventana de gestión de los reactivos indica que es necesario cambiar uno o varios reactivos :

- colocar un nuevo contenedor de tampón de análisis y / o,
- llenar el contenedor de lavado con la solución de lavado reconstituida y / o,
- llenar el contenedor de limpieza con agua destilada o desionizada filtrada y / o,
- vaciar e contenedor de desechos.

***ATENCIÓN : No use agua destilada comercial, como por ejemplo el agua para planchar (riesgo de deterioro importante de los capilares). Use exclusivamente agua de calidad ultra pura, como el agua para inyección.***

**IMPORTANTE :** Se recomienda lavar con agua destilada o desionizada en abundancia el contenedor de limpieza antes de llenarlo.

LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL CAPILLARYS 2.

## CONTROL DE CALIDAD

**Después de cada cambio del contenedor del tampón de análisis (incluso si el lote no cambia) o de modo de trabajo, después de un ciclo de limpieza de los capilares con CAPICLEAN o después de activar los capilares**, y antes de iniciar una nueva serie de análisis, es necesario realizar dos series de análisis con el Control Hb AF, SEBIA, referencia n° 4777, usando el cargador n° 0 específico previsto a este efecto (ver el capítulo REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS).
También se recomienda incluir una sangre de control en cada serie de análisis (por ejemplo, una muestra de control que contenga las hemoglobinas A, F, S y C, como el Control Hb AFSC, SEBIA, referencia n° 4792, o el Control Hb AF, SEBIA, referencia n° 4777).

## RESULTADOS

### Valores

La detección directa en el capilar a 415 nm permite definir las concentraciones relativas (porcentajes) de cada fracción.

### Interpretación

*Ver PERFILES ELECTROFORÉTICOS, figuras 1 - 8.*

Las diferentes zonas de migración de las variantes (identificadas como C1 a C12) aparecen en la ventana de edición de las curvas y en el informe de resultados. Al pasar el cursor del ratón sobre el nombre de una zona aparece una burbuja informativa que indica las variantes posibles de la hemoglobina que migran en esa zona.
Para cada fracción, la posición del máximo define la zona de migración.
Ver la tabla que muestra las variantes potenciales presentes en cada zona.
***ATENCIÓN : La graduación del eje de abscisas no puede en ningún caso usarse para la identificación de una variante de la hemoglobina.***

*1. Anomalías cualitativas : Hemoglobinopatías*

La mayoría son anomalías estructurales, debidas a la sustitución por mutación de un aminoácido por otro en una de las cadenas. Las consecuencias de la mutación varían en función de la posición del aminoácido mutado y del que le remplaza, siendo particularmente necesaria la integridad de algunas partes de la molécula para que sea viable y funcione correctamente.
Se han definido y descrito más de 900 variantes de la hemoglobina adulta. Las primeras hemoglobinas anormales estudiadas, y las más numerosas, son debidas a una modificación de la carga eléctrica global de la molécula, lo que permite detectarlas claramente por electroforesis.
Cinco hemoglobinas anormales principales presentan un interés particular desde un punto de vista antropológico y médico : S, C, E, O-Arab y D.
La técnica CAPILLARYS SANGRE DE CORDÓN está destinada a la detección de las hemoglobinopatías y las alfa-talasemias.

**Hemoglobina S**

Es la variante más frecuente, y es debida a una sustitución por mutación de un ácido glutámico de la cadena ß (aminoácido ácido nº 6) por una valina (aminoácido neutro) : presenta pues un punto isoeléctrico aumentado respecto a la hemoglobina A. Su carga negativa global está por tanto disminuida en el pH de análisis : esta hemoglobina migra más rápidamente que las hemoglobinas A y F. En la técnica CAPILLARYS SANGRE DE CORDÓN, en tampón alcalino, la hemoglobina S migra antes de las fracciones A y F.

**Hemoglobina C**

La mutación es debida a la sustitución de un ácido glutámico de la cadena ß por una lisina (aminoácido alcalino nº 6) : presenta pues un punto isoeléctrico aumentado respecto a la hemoglobina A. Su carga negativa global está por tanto disminuida en el pH de análisis : esta hemoglobina migra más rápidamente que las hemoglobinas A, F y S.
Las hemoglobinas C, E y O-Arab no se superponen en el perfil electroforético y pueden por tanto ser distinguidas fácilmente.

**Hemoglobina E**

Un ácido glutámico de la cadena ß (nº 26) está sustituido por una lisina. En la técnica CAPILLARYS SANGRE DE CORDÓN, la hemoglobina E migra en posición anódica respecto a la hemoglobina C, de la que está totalmente separada. Es por tanto posible distinguir un paciente heterocigoto C / E.

**Hemoglobina O-Arab**

Un ácido glutámico de la cadena ß (nº 121) está sustituido por una lisina. En la técnica CAPILLARYS SANGRE DE CORDÓN, la hemoglobina O-Arab migra entre las fracciones E y C, de las que está totalmente separada. Cuando la sangre presenta una hemoglobina A2, la hemoglobina O-Arab migra en la misma posición. Como el análisis se realiza en sangre de recién nacidos que presentan una cantidad de hemoglobina 2 muy baja, esta última no interfiere en la detección de la hemoglobina O-Arab.

**Hemoglobina D (-Los Angeles)**

Un ácido glutámico de la cadena ß (nº 121) está sustituido por una glutamina. En la técnica CAPILLARYS SANGRE DE CORDÓN, la hemoglobina D (denominada D-Punjab, D-Los Angeles, D-Chicago ó D-Portugal) migra en posición anódica respecto a la hemoglobina S, lo que permite distinguirla de ésta.

*2. Anomalías cuantitativas : Talasemias*

Constituyen un grupo bastante heterogéneo de afecciones genéticas caracterizadas por la reducción de la tasa de síntesis de una o varias cadenas de la hemoglobina. El mecanismo de esta reducción a escala molecular todavía no es bien conocido.
Existen diferentes síndromes talasémicos :

**Alfa talasemias**

Se caracterizan por la disminución de la síntesis de las cadenas α, afectando por consiguiente a la síntesis de las 3 hemoglobinas fisiológicas. El exceso de síntesis de las cadenas ß y γ respecto a las cadenas α provoca la formación de tetrámeros sin cadena α :
- Hemoglobina Bart = γ 4,
- Hemoglobina H = ß 4.

La hemoglobina Bart, que posee un punto isoeléctrico relativamente bajo, está presente en recién nacidos, aunque también aparece menos frecuentemente en adultos. La hemoglobina H no es visible en el recién nacido. En la técnica CAPILLARYS SANGRE DE CORDÓN, la hemoglobina Bart migra en una posición mucho más anódica que la hemoglobina F (y sólo está presente en forma de una fracción ancha poco focalizada).

**Beta talasemias**

Se caracterizan por la disminución de la síntesis de las cadenas ß. Sólo se ve afectada la síntesis de la hemoglobina A. Como el análisis se realiza en sangre de cordón, la cantidad de hemoglobina A2 presente en la muestra es insuficiente para permitir el diagnóstico de una beta talasemia.
La técnica CAPILLARYS SANGRE DE CORDÓN no permite por tanto diagnosticar la beta talasemia en recién nacidos.

*3. Notas*

- La hemoglobina A2 está generalmente ausente o presente en muy baja cantidad en las muestras de sangre de cordón umbilical de recién nacidos, en función del término del embarazo. Una sangre normal de recién nacido presenta pues una hemoglobina F mayoritaria, una hemoglobina A minoritaria y una hemoglobina A2 ausente o presente en muy baja cantidad. Si aparece un pico más grande en la zona de migración de la Hb A2 hay que sospechar la presencia de una variante.
  En ese caso, el pico que aparezca en la zona de migración de la Hb A2 será detectado por el sistema CAPILLARYS 2, pero deberán realizarse análisis complementarios para confirmar la naturaleza de la variante.
- En caso de ausencia de la hemoglobina A o de que esté presente en baja cantidad (sangre de bebé prematuro, deficiencia de síntesis de la cadena beta, etcétera), o en caso de analizar muestras antiguas, puede observarse una fracción en la zona de migración C9 que precede a la zona de migración C10 de la Hb A. Esta fracción contiene hemoglobina F acetilada y hemoglobina F degradada. El sistema CAPILLARYS 2 está programado para evitar confundir esta fracción con la hemoglobina A.
- Al analizar sangres de recién nacidos, las muestras que contengan Hb F en concentración elevada pueden presentar una fracción Hb A alterada, especialmente a causa de la migración de Hb F degradada en esa zona. El porcentaje de Hb A indicado por el programa puede estar entonces sobreestimado. Además, en caso de presencia de variantes de la hemoglobina (> 4 %; S, C, E ó D-Punjab por ejemplo) en una sangre que contenga una concentración elevada de Hb F (> 60 %), es necesario realizar análisis complementarios para confirmar la presencia de Hb A.

**IMPORTANTE :** En caso de ausencia de hemoglobina A y presencia de una o varias variantes anormales X de la hemoglobina, es posible tener en cuenta la intensidad de los picos de las fracciones anormales X y de la hemoglobina que se sitúa en la zona de la Hb F degradada para analizar el perfil : una fracción débil presente en las zonas de migración C9 y C10 no puede ser considerada como Hb A si la o las fracciones anormales están presentes en gran cantidad. La mayoría de casos de heterocigosis A / X muestran picos de Hb A y de variante X casi equivalentes en altura, siendo a veces más elevado el pico de Hb A que el pico de la variante X y raramente al revés.

- Algunas variantes de la hemoglobina (Hb Porto-Alegre ó Hb Q-Tailandia por ejemplo) migran muy cerca de la hemoglobina F y pueden migrar alrededor de su zona de migración, siendo entonces ocultadas por esta última. No es posible ninguna confusión, ya que la fracción Hb F siempre es la fracción ampliamente mayoritaria en sangre de recién nacido.
- Una alfa talasemia (deleción de una a tres cadenas α) puede ser detectada en el perfil electroforético por la presencia de la hemoglobina Bart. La deleción de una sola cadena induce una alfa talasemia denominada « silenciosa » porque es asintomática. La deleción de 2 ó 3 cadenas α conduce a la presencia de Hb Bart en mayor cantidad en el perfil electroforético.
- El análisis de sangres de cordón de recién nacidos transfusionados puede dar lugar a un perfil con una fracción Hb A elevada, alterando así el diagnostico. Una drepanocitosis homocigota puede ser enmascarada y confundida con un diagnóstico de heterocigosis A / S. Es indispensable confrontar este resultado con el análisis hematológico y realizar análisis complementarios para confirmar el diagnóstico.
- Las mutaciones de la cadena gamma implican la aparición de hemoglobinas anormales en diferentes zonas de migración del perfil electroforético. Estas hemoglobinas han sido mucho menos estudiadas que las hemoglobinas resultantes de la mutación del resto de cadenas.

## Interferencias y limitaciones

- Ver MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS.
- No use muestras de sangre total no sedimentada.
- No use muestras de sangre antiguas o mal conservadas, ya que la presencia de hemoglobinas degradadas puede observarse en el perfil electroforético en forma de artefactos más o menos numerosos después de 7 días de conservación.
- Si las muestras se han conservado más de 10 días, se observa la presencia de aglomerados viscosos en los glóbulos rojos : es indispensable eliminarlos antes de realizar el análisis.
- Cuando se detecte la presencia de una hemoglobina anormal, se recomienda usar otras técnicas de identificación (por ejemplo, electroforesis de las cadenas de globina) o consultar a un laboratorio especializado para un tipado preciso de la variante.

  **IMPORTANTE :** Es indispensable realizar el análisis hematológico como resultado complementario.
- En la técnica CAPILLARYS SANGRE DE CORDÓN, la presencia en la muestra de sangre de concentraciones elevadas de triglicéridos (hasta 32 mmol/L) o de bilirrubina (hasta 161 mg/L) no interfiere en el análisis de las hemoglobinas y la detección de hemoglobinas anormales.
- Teniendo en cuenta los principios analíticos de las técnicas actuales (principios de la electroforesis de zona, resolución), no hay garantías en cuanto a la detección total de todas las variantes de la hemoglobina.

## Asistencia técnica

Contacte con el Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA en caso de que el análisis sea defectuoso.
Puede solicitar al Servicio de Asistencia Técnica de SEBIA las fichas de datos de seguridad de los diferentes reactivos del kit, así como la información relativa a la eliminación de los desechos.

## BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAPHY

1. J. Bardakdjian-Michau, J.-L. Dhondt, R. Ducrocq, F. Galactéros, A. Guyard, F.-X. Huchet, A. Lahary, D. Lena-Russo, P. Maboudou, M.-L. North, C. Prehu, A.-M. Soummer, M. Verschelde, H. Wajcman (2003) Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. *Ann. Biol. Clin.*, 61, 401-409.
2. V.F. Fairbanks, ed. (1980) Hemoglobinopathies and thalassemia: Laboratory methods and case studies. Brian C. Decker, New York.
3. F. Galacteros (1986) Thalassémie, drépanocytose et autres hémoglobinopathies. *Techniques et Biologie*, 3, 174-178.
4. JM Hempe, JN Granger and RD Craver (1997) Capillary isoelectric focusing of hemoglobin variants. *Electrophoresis*, 18, 1785-1795.
5. T.H.J. Huisman and J.H.P. Jonxis (1977) The hemoglobinopathies: techniques of identification. Marcel Dekker, New York.
6. Jellum E *et al*. Diagnostic applications of chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* B, 689, 155-164 (1997).
7. Joutovsky A, Hadzi-Nesic J and Nardi MA (2004) HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies : a study of 60 000 samples in a clinical diagnostic laboratories. *Clin. Chem.*, 50, 10, 1736-1747.
8. J.S. Krauss, P.A. Drew, M.H. Jonah, M. Trinh, S. Shell, L. Black and C.R. Baisden (1986) Densitometry and microchromatography compared for determination of the hemoglobin C and A2 proportions in hemoglobin C and hemoglobin SC disease and in hemoglobin C trait. *Clin. Chem.* 32, 5, 860-863.
9. Landers JP. Clinical Capillary Electrophoresis. *Clin. Chem.*, 41, 495-509 (1995).
10. C. Livingstone (1986) The hemoglobinopathies. Edit. London.-
11. M. Maier-Redelsberger, R. Girot (1989) Diagnostic biologique des maladies de l'hémoglobine. *Feuillets de biologie*, 170.
12. Oda RP *et al*. Capillary electrophoresis as a clinical tool for the analysis of protein in serum and other body fluids. *Electrophoresis*, 18, 1715-1723 (1997).
13. R.G. Schneider (1978) Methods for detection of hemoglobin variants and hemoglobinopathies in the routine clinical laboratory. CRC *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 9, 243-271.
14. L. Vovan, D. Lara-Russo, A. Orsini (1985) Diagnostic biologique des hémoglobinoses. *Ann. Pédiat.* 32, 9, 780-789.
15. http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html : Hbvar : A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias.
16. http://www.isns-neoscreening.org/agenda.htm.
17. F Boemer, O Ketelslegers, JM Minon, V Bours, R Schoops (2008) Newborn screening for sickle cell disease using tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.*, 54, 12, 2036-2041.
18. Lubin BH, Witkowska HE, Kleman K (1991) Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. *Clin. Biochem.*, 24, 363-374.
19. B Gulbis, B Fontaine, F Vertongen, F Cotton (2003) The place of capillary electrophoresis techniques in screening for haemoglobinopathies. *Ann. Clin. Biochem.*, 40, 659-662.
20. Aguilar-Martinez P *et al* (2010) Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies. *Ann. Biol. Clin.*, 68 (4) : 455-464.
21. Wendling A. Procédures de diagnostic ou de dépistage : Justification et validité d'un test de diagnostic ou de dépistage-sensibilité-spécificité. *Impact-Internat,* 1986 ; Sept : 93-97.

## TABLEAU / TABLE

### CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) : VARIANTS POTENTIELS PRÉSENTS DANS CHAQUE ZONE POTENTIAL VARIANTS LOCATED IN EACH ZONE

| Zone | Hémoglobines / Hemoglobins (Hb) |
|---|---|
| Z1 | Hb Santa Ana (chaîne libre alpha), Hb Mizuho (pic mineur), Hb δA'2, Hb αA2, Hb F-Hull, Hb T-Cambodia, variants de Hb A2 "Arya", de Hb A2 "Hasharon", de Hb A2 "Fort de France", de Hb A2 "Ottawa", de Hb A2 "Chad", de Hb A2 "G-Norfolk", de Hb A2 "Matsue-Oki", de Hb A2 "Stanleyville II", de Hb A2 "Montgomery", de Hb A2 "Winnipeg", de Hb A2 "Q-India", de Hb A2 « G-Pest", de Hb A2 "Memphis", de Hb A2 "Inkster", de Hb A2 "Chapel Hill" et de Hb A2 "Q-Thailand" |
| | *Hb Santa Ana (free alpha chain), Hb Mizuho (minor peak), Hb δA'2, Hb αA2, Hb F-Hull, Hb T-Cambodia, "Arya" Hb A2 variant, "Hasharon" Hb A2 variant, "Fort de France" Hb A2 variant, "Ottawa" Hb A2 variant, "Chad" Hb A2 variant, "G-Norfolk" Hb A2 variant, "Matsue-Oki" Hb A2 variant, "Stanleyville II" Hb A2 variant, "Montgomery" Hb A2 variant, "Winnipeg" Hb A2 variant, "Q-India" Hb A2 variant, "G-Pest" Hb A2 variant, "Memphis" Hb A2 variant, "Inkster" Hb A2 variant, "Chapel Hill" Hb A2 variant, "Q-Thailand" Hb A2 variant* |
| Z2 | Hb C, Hb F-Texas, Hb Constant Spring, Hb C-Harlem (C-Georgetown), variant de Hb A2 "Setif", variant de Hb A2 "Bassett", variant de Hb A2 "Swan River", variant de Hb A2 "Manitoba I", variant de Hb A2 "Manitoba II" |
| | *Hb C, Hb F-Texas, Hb Constant Spring, Hb C-Harlem (C-Georgetown), "Setif" Hb A2 variant, "Bassett" Hb A2 variant, "Swan River" Hb A2 variant, "Manitoba I" Hb A2 variant, "Manitoba II" Hb A2 variant* |
| Z3 | Hb A2, Hb O-Arab, Hb Chad (E-Keelung), Hb E-Saskatoon |
| | *Hb A2, Hb O-Arab, Hb Chad (E-Keelung), Hb E-Saskatoon* |
| Z4 | Hb E, Hb Köln (Ube-1), Hb Buenos Aires (pic mineur), Hb Agenogi, Hb G-Siriraj, Hb Santa Ana, Hb A2-Babinga, Hb M-Saskatoon (pic mineur), variant de Hb A2 "M-Iwate", Hb C dégradée |
| | *Hb E, Hb Köln (Ube-1), Hb Buenos Aires (minor peak), Hb Agenogi, Hb G-Siriraj, Hb Santa Ana, Hb A2-Babinga, Hb M-Saskatoon (minor peak), "M-Iwate" Hb A2 variant, denatured Hb C* |
| Z5 | Hb S, Hb Dhofar (Yukuhashi), Hb Arya, Hb Hasharon (Sinai), Hb Handsworth, Hb Ottawa (Siam), Hb S-Antilles, Hb Fort de France, Hb Hamadan, Hb Montgomery, variant de Hb A2 "Lombard", variant de Hb A2 "Cemenelum", variant de Hb A2 "Jackson", Hb O-Arab dégradée |
| | *Hb S, Hb Dhofar (Yukuhashi), Hb Arya, Hb Hasharon (Sinai), Hb Handsworth, Hb Ottawa (Siam), Hb S-Antilles, Hb Fort de France, Hb Hamadan, Hb Montgomery, "Lombard" Hb A2 variant, "Cemenelum" Hb A2 variant, "Jackson" Hb A2 variant, denatured Hb O-Arab* |
| Z6 | Hb D-Punjab (D-Los Angeles), Hb Stanleyville II, Hb Osu Christiansborg, Hb Leiden, Hb G-Philadelphie, Hb Muravera, Hb D-Bushman, Hb G-Norfolk, Hb Matsue-Oki, Hb D-Ouled Rabah, Hb Lepore (Lepore-BW), Hb Muskegen, Hb D-Ibadan, Hb Buenos Aires (pic mineur), Hb Summer Hill, Hb Q-India, Hb Q-Iran, Hb Korle-Bu (G-Accra), Hb Köln, Hb Fort Worth, Hb G-Taipei, Hb Winnipeg, Hb G-Siriraj, Hb G-Pest, Hb D-Iran, Hb G-Coushatta (G-Saskatoon), Hb Inkster, Hb Setif, Hb Memphis, Hb P-Nilotic, Hb Willamette, variant de Hb A2 "J-Rajappen", variant de Hb A2 "J-Anatolia", variant de Hb A2 "J-Oxford", variant de Hb A2 "J-Broussais", variant de Hb A2 "J-Toronto", variant de Hb A2 "Mexico", variant de Hb A2 "J-Habana", variant de Hb A2 "J-Rovigo", Hb E dégradée |
| | *Hb D-Punjab (D-Los Angeles), Hb Stanleyville II, Hb Osu Christiansborg, Hb Leiden, Hb G-Philadelphia, Hb Muravera, Hb D-Bushman, Hb G-Norfolk, Hb Matsue-Oki, Hb D-Ouled Rabah, Hb Lepore (Lepore-BW), Hb Muskegen, Hb D-Ibadan, Hb Buenos Aires (minor peak), Hb Summer Hill, Hb Q-India, Hb Q-Iran, Hb Korle-Bu (G-Accra), Hb Köln, Hb Fort Worth, Hb G-Taipei, Hb Winnipeg, Hb G-Siriraj, Hb G-Pest, Hb D-Iran, Hb G-Coushatta (G-Saskatoon), Hb Inkster, Hb Setif, Hb Memphis, Hb P-Nilotic, Hb Willamette, "J-Rajappen" Hb A2 variant, "J-Anatolia" Hb A2 variant, "J-Oxford" Hb A2 variant, "J-Broussais" Hb A2 variant, "J-Toronto" Hb A2 variant, "Mexico" Hb A2 variant, "J-Habana" Hb A2 variant, "J-Rovigo" Hb A2 variant, denatured Hb E* |
| Z7 | Hb F, Hb Q-Thailand (G-Taichung), Hb Alabama, Hb Chapel Hill, Hb Bassett, Hb G-San José, Hb Richmond, Hb Barcelona, Hb Geldrop Santa Anna, Hb Porto Alegre, Hb Swan River, Hb Presbyterian, Hb Burke, Hb Manitoba I, Hb Manitoba II, variant de Hb A2 "J-Paris-I", Hb S dégradée |
| | *Hb F, Hb Q-Thailand (G-Taichung), Hb Alabama, Hb Chapel Hill, Hb Bassett, Hb G-San Jose, Hb Richmond, Hb Barcelona, Hb Geldrop Santa Anna, Hb Porto Alegre, Hb Swan River, Hb Presbyterian, Hb Burke, Hb Manitoba I, Hb Manitoba II, "J-Paris-I" Hb A2 variant, denatured Hb S* |
| Z8 | Hb F acétylée, Hb Hinsdale, Hb Alberta, Hb Kempsey, Hb Atlanta, Hb Athens-GA (Waco) |
| | *Acetylated Hb F, Hb Hinsdale, Hb Alberta, Hb Kempsey, Hb Atlanta, Hb Athens-GA (Waco)* |
| Z9 | Hb A, Hb Gorwihl (Hinchingbrooke), Hb Phnom Penh, Hb Silver Springs, Hb La Coruna, Hb Bougardirey-Mali, Hb Austin, Hb Buenos Aires (pic majeur), Hb Chicago, Hb Toulon, Hb Okayama, Hb Fontainebleau, Hb Raleigh, Hb Hekinan, Hb Mosella, Hb Dallas, Hb Aztec, Hb Little Rock, Hb Frankfurt, Hb Bethesda, Hb M-Boston (M-Osaka), Hb Brisbane (Great Lakes), Hb Mizuho, Hb Grange Blanche, Hb San Diego, Hb M-Saskatoon (pic majeur), Hb Malmö, Hb Minneapolis Laos, Hb Syracuse, Hb Camperdown |
| | *Hb A, Hb Gorwihl (Hinchingbrooke), Hb Phnom Penh, Hb Silver Springs, Hb La Coruna, Hb Bougardirey-Mali, Hb Austin, Hb Buenos Aires (major peak), Hb Chicago, Hb Toulon, Hb Okayama, Hb Fontainebleau, Hb Raleigh, Hb Hekinan, Hb Mosella, Hb Dallas, Hb Aztec, Hb Little Rock, Hb Frankfurt, Hb Bethesda, Hb M-Boston (M-Osaka), Hb Brisbane (Great Lakes), Hb Mizuho, Hb Grange Blanche, Hb San Diego, Hb M-Saskatoon (major peak), Hb Malmö, Hb Minneapolis Laos, Hb Syracuse, Hb Camperdown* |
| Z10 | Hb Hope, Hb M-Iwate (M-Kankakee), Hb Camden (Tokuchi) |
| | *Hb Hope, Hb M-Iwate (M-Kankakee), Hb Camden (Tokuchi)* |

## TABLEAU / TABLE

**CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) : VARIANTS POTENTIELS PRÉSENTS DANS CHAQUE ZONE**
**POTENTIAL VARIANTS LOCATED IN EACH ZONE**

| Zone | Hémoglobines / Hemoglobins (Hb) |
|---|---|
| Z11 | Hb A dégradée, Hb Providence (pic X-Asn), Hb K-Woolwich, Hb Lombard, Hb Kaohsiung (New York), Hb Fannin Lubbock, Hb Andrew Minneapolis, Hb Jackson, Hb Himeji, variant de Hb A2 "I (I-Texas)" |
| | *Denatured Hb A, Hb Providence (X-Asn peak), Hb K-Woolwich, Hb Lombard, Hb Kaohsiung (New York), Hb Fannin Lubbock, Hb Andrew Minneapolis, Hb Jackson, Hb Himeji, "I (I-Texas)" Hb A2 variant* |
| Z12 | Hb Bart, Hb Cemenelum, Hb J-Calabria (J-Bari), Hb Providence (pic X-Asp), Hb J-Rajappen, Hb Grady, Hb J-Anatolia, Hb J-Broussais (Tagawa-I), Hb J-Chicago, Hb J-Oxford (I-Interlaken), Hb J-Toronto, Hb J-Meinung (J-Bangkok), Hb Ube-2, Hb Mexico (J-Paris-II), Hb J-Habana, Hb J-Baltimore (N-New Haven), Hb J-Paris-I (J-Aljezur) |
| | *Hb Bart's, Hb Cemenelum, Hb J-Calabria (J-Bari), Hb Providence (X-Asp peak), Hb J-Rajappen, Hb Grady, Hb J-Anatolia, Hb J-Broussais (Tagawa-I), Hb J-Chicago, Hb J-Oxford (I-Interlaken), Hb J-Toronto, Hb J-Meinung (J-Bangkok), Hb Ube-2, Hb Mexico (J-Paris-II), Hb J-Habana, Hb J-Baltimore (N-New Haven), Hb J-Paris-I (J-Aljezur)* |
| Z13 | Hb J-Rovigo, Hb N-Baltimore (Hopkins-I), Hb J-Norfolk (Kagoshima), Hb J-Kaohsiung (J-Honolulu) |
| | *Hb J-Rovigo, Hb N-Baltimore (Hopkins-I), Hb J-Norfolk (Kagoshima), Hb J-Kaohsiung (J-Honolulu)* |
| Z14 | Hb N-Seattle |
| | *Hb N-Seattle* |
| Z15 | Hb H, Hb I (I-Texas) |
| | *Hb H, Hb I (I-Texas)* |

## SCHÉMAS / FIGURES

### CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)
### PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES - ELECTROPHORETIC PATTERNS

**Figure 1**

Sang normal
*Normal blood sample*

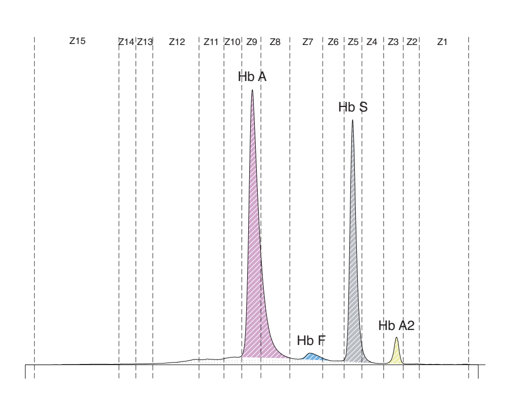
**Figure 2**

Sang bêta-thalassémique
*Blood sample with beta-thalassemia*

**Figure 3**

Sang avec variant Hb C
*Blood sample with Hb C variant*

**Figure 4**



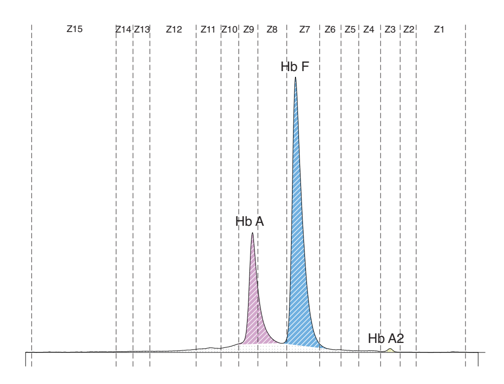

Sang avec variant hétérozygote Hb S
*Blood sample with Hb S heterozygote variant*

# SCHÉMAS / FIGURES

## CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)
## PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES - ELECTROPHORETIC PATTERNS

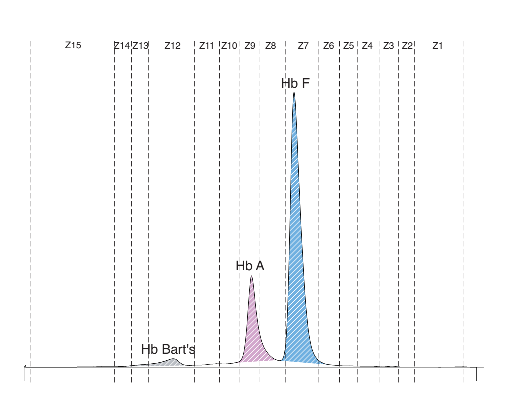


### Figure 5



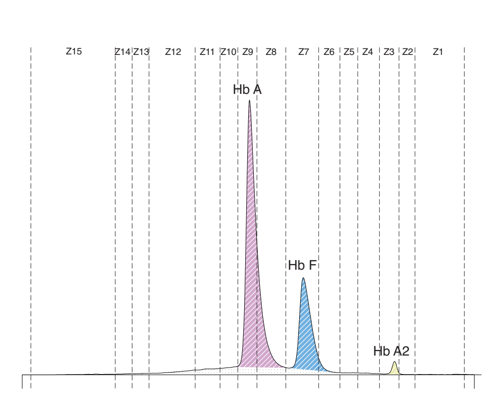

Sang de bébé (agé de 3 semaines)
*Baby blood sample (3 weeks old)*

### Figure 6



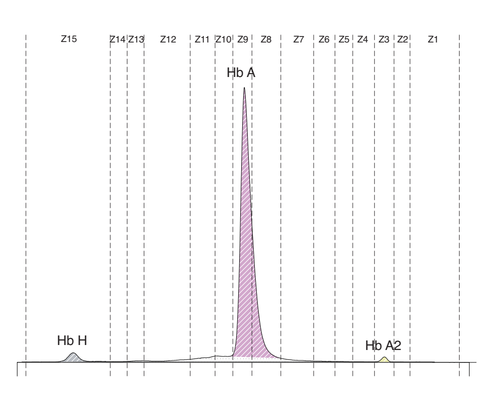

Sang de bébé avec Hb Bart's
*Baby blood sample with Hb Bart's*

### Figure 7




Sang avec Hb F (jeune enfant)
*Blood sample with Hb F (young child)*

### Figure 8



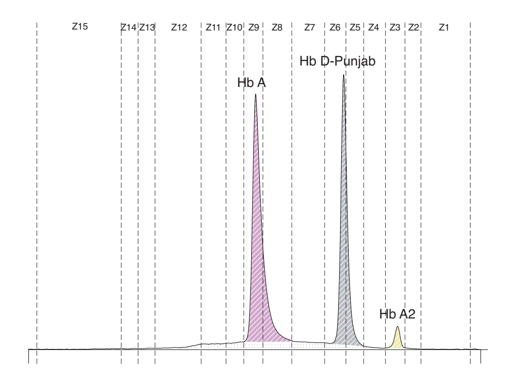

Sang avec Hb H
*Blood sample with Hb H*

## SCHÉMAS / FIGURES

### CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)
### PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES - ELECTROPHORETIC PATTERNS



**Figure 9**

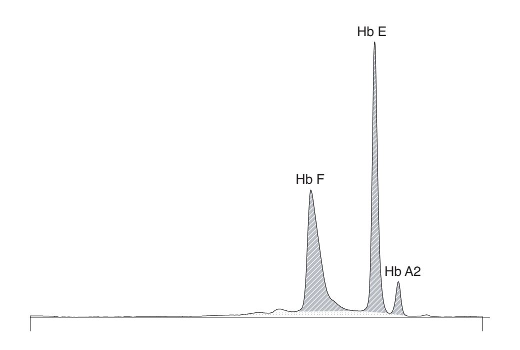



Sang avec variant Hb D-Punjab
*Blood sample with Hb D-Punjab variant*

**Figure 10**

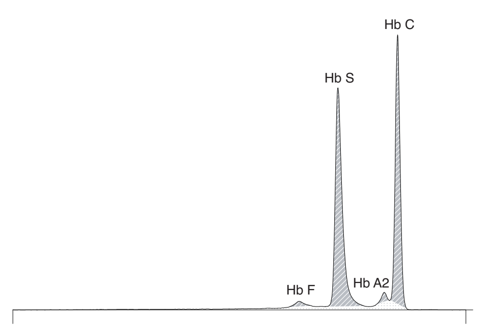
Sang avec variant delta Hb A'2
*Blood sample with delta Hb A'2 variant*

**Figure 11**




Sang avec variant homozygote Hb E et fraction Hb F élevée
*Blood sample with homozygote Hb E variant and elevated Hb F*

**Figure 12**

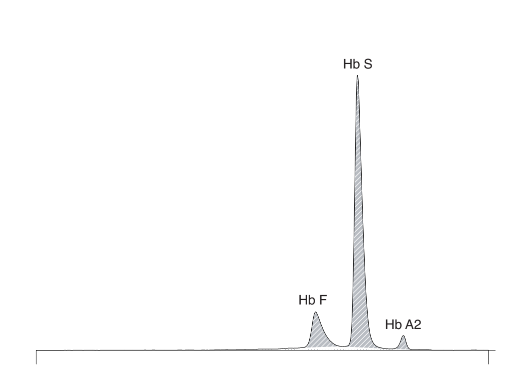



Sang avec variants hétérozygotes Hb S et Hb C
*Blood sample with Hb S & Hb C heterozygote variants*

## SCHÉMAS / FIGURES

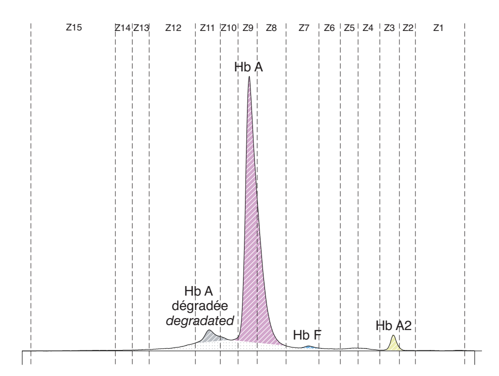
### CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)
### PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES - ELECTROPHORETIC PATTERNS



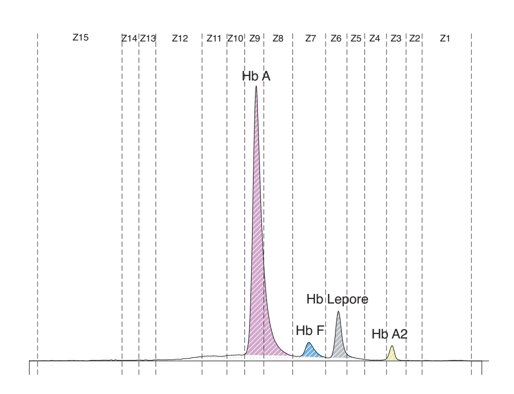

Sang avec variant homozygote Hb S (et Hb F)
*Blood sample with Hb S homozygote variant (and Hb F)*




Sang avec Hb A dégradée (Hb A3) et Hb F faible
*Blood sample with degradated Hb A (Hb A3) and faint Hb F*

**Figure 15**



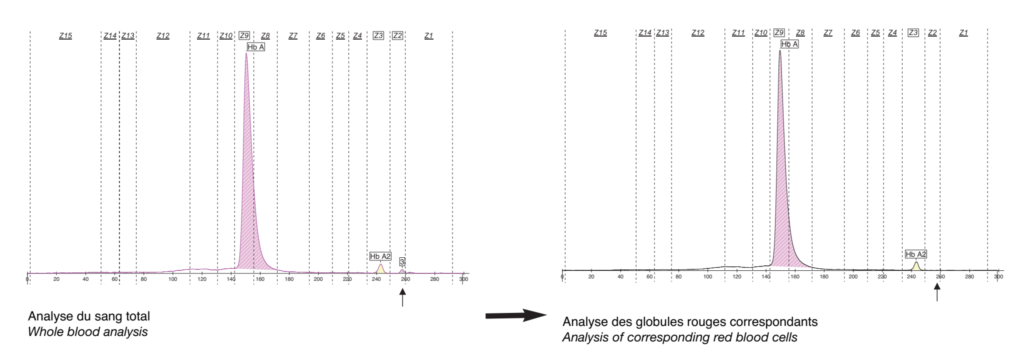

Sang avec variant Hb Lepore
*Bood sample with Hb Lepore variant*

## SCHÉMAS / FIGURES

### CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) - CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING
### PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES - ELECTROPHORETIC PATTERNS

**Figure 16**

Fraction supplémentaire en zone de migration Z2 (protéines plasmatiques)
*Additional fraction in Z2 migration zone (plasmatic proteins)*

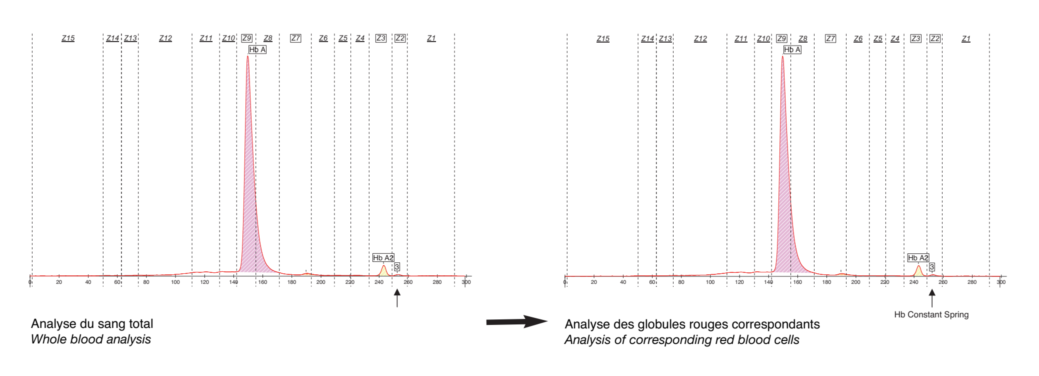



Analyse du sang total
*Whole blood analysis*

Analyse des globules rouges correspondants
*Analysis of corresponding red blood cells*

**Figure 17**

Fraction supplémentaire en zone de migration Z2 (Hb Constant spring)
*Additional fraction in Z2 migration zone (Hb Constant spring)*




Analyse du sang total
*Whole blood analysis*

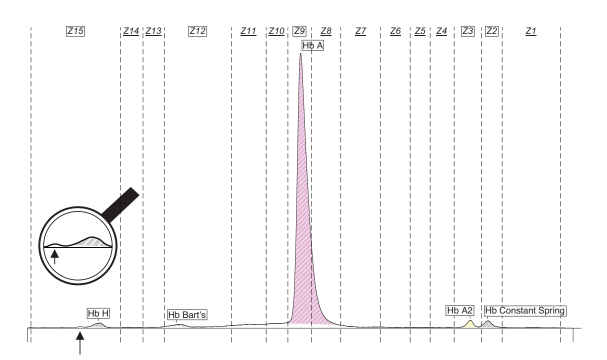
Analyse des globules rouges correspondants
*Analysis of corresponding red blood cells*

## SCHÉMAS / FIGURES

### CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) - CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING
### PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES - ELECTROPHORETIC PATTERNS

**Figure 18**

Fraction supplémentaire en zone de migration Z15
*Additional fraction in Z15 migration zone*



## TABLEAU / TABLE

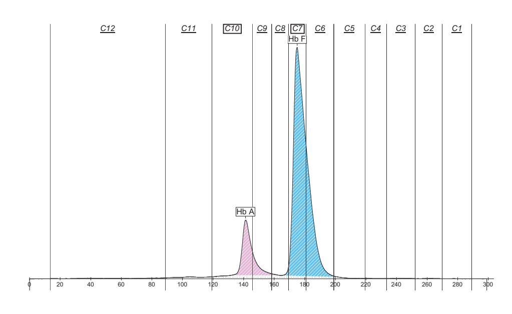
### CAPILLARYS SANGS DE CORDONS : VARIANTS POTENTIELS PRÉSENTS DANS CHAQUE ZONE
### CAPILLARYS CORD BLOOD : POTENTIAL VARIANTS LOCATED IN EACH ZONE

| Zone | Hémoglobines / Hemoglobins (Hb) |
|---|---|
| **C1** | Hb C |
| | *Hb C* |
| **C2** | Hb A2, Hb O-Arab |
| | *Hb A2, Hb O-Arab* |
| **C3** | Hb E, methémogobine, Hb C dégradée |
| | *Hb E, methemoglobin, denatured Hb C* |
| **C4** | Hb S |
| | *Hb S* |
| **C5** | Hb D-Punjab (D-Los Angeles), Hb G-Philadelphie, Hb Korle-Bu (G-Accra), Hb E dégradée |
| | *Hb D-Punjab (D-Los Angeles), Hb G-Philadelphia, Hb Korle-Bu (G-Accra), denatured Hb E* |
| **C6** | Hb S dégradée |
| | *Denatured Hb S* |
| **C7** | Hb F |
| | *Hb F* |
| **C9** | Hb F dégradée |
| | *Denatured Hb F* |
| **C10** | Hb A |
| | *Hb A* |
| **C11** | Hb A dégradée, Hb Hope |
| | *Denatured Hb A, Hb Hope* |
| **C12** | Hb Bart |
| | *Hb Bart's* |

# SCHÉMAS / FIGURES

## CAPILLARYS SANGS DE CORDONS / CAPILLARYS CORD BLOOD
## PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES - ELECTROPHORETIC PATTERNS

**Figure 1**

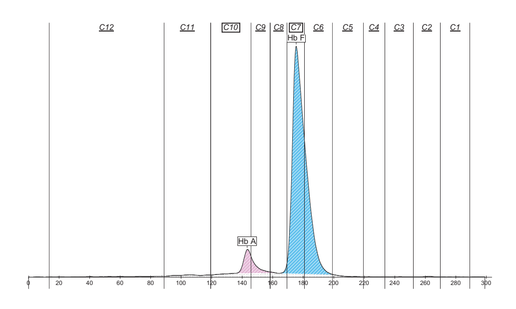



Sang de cordon normal
*Normal cord blood sample*

**Figure 2**

Sang de cordon normal avec Hb A2
*Normal cord blood sample with Hb A2*

**Figure 3**




Sang de cordon avec Hb A faible
*Cord blood sample with faint Hb A*

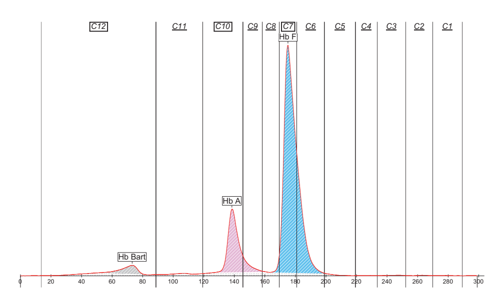
**Figure 4**

Sang de cordon avec variant Hb S
*Cord blood sample with Hb S variant*

# SCHÉMAS / FIGURES

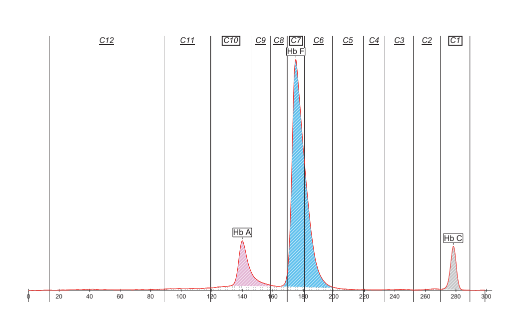
## CAPILLARYS SANGS DE CORDONS / CAPILLARYS CORD BLOOD
## PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES - ELECTROPHORETIC PATTERNS

**Figure 5**



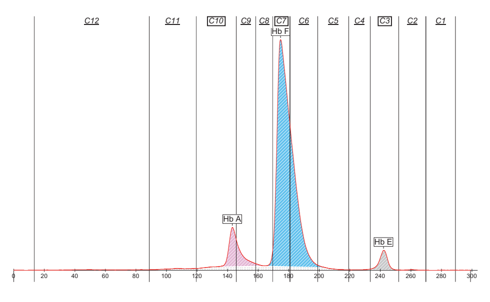

Sang de cordon avec variant Hb Bart
*Cord blood sample with Hb Bart's variant*

**Figure 6**



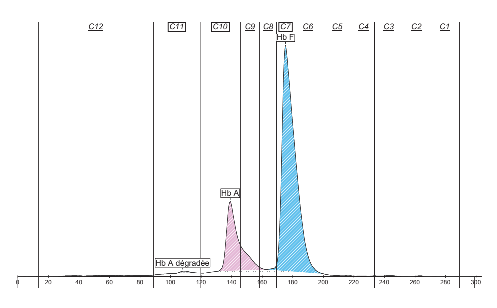

Sang de cordon avec variant Hb C
*Cord blood sample with Hb C variant*

**Figure 7**




Sang de cordon avec variant Hb E
*Cord blood sample with Hb E variant*

**Figure 8**




Sang de cordon avec Hb F dégradée (en zone C9) et
Hb A dégradée (en zone C11)
*Cord blood sample with degraded Hb F (C9 zone) and*
*degraded Hb A (C11 zone)*